

X

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service  
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : J. FOURNIER

QR  
I  
A475  
v.100  
Jan.-June  
1961  
PER

TOME CENTIÈME  
Janvier-Juillet 1961

MASSON ET C<sup>IE</sup>, ÉDITEURS  
Libraires de l'Académie de Médecine  
120, Boulevard Saint-Germain  
PARIS

PARIS. — ANCIENNE IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1961

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

**PROBLÈMES DE L'INCUBATION LOCALE  
DE SPIROCHETA PALLIDA DANS LA SYPHILIS DU LAPIN**

par P. GASTINEL, A. VAISMAN et F. DUNOYER (\*)

(*Institut Alfred Fournier, Paris*)

L'expérimentation a démontré amplement que l'infection syphilitique ne comporte pas une phase d'incubation générale précédant la période de diffusion infectieuse. On sait parfaitement aujourd'hui que, très rapidement, on peut constater la virulence du sang et celle surtout des voies lymphatiques. En trente minutes à une heure après l'inoculation, nombre d'auteurs, depuis Kolle, ont pu mettre en évidence le caractère virulent du ganglion lymphatique par passages à l'animal. La syphilis apparaît donc comme une infection généralisée hâtive, constituée bien avant l'apparition de l'accident anatomique au point de pénétration.

Mais, à l'inverse, le problème interprétatif de l'*incubation locale* demeure plein d'incertitude. Quelles sont les phases par lesquelles évoluent les tréponèmes d'une émulsion virulente jusqu'à ce que survienne la lésion initiale en la région inoculée ?

Ce problème a déjà fait l'objet de quelques travaux. En 1935 Bessemans et van Healst [1] envisagèrent le même sujet en effectuant la numération au fond noir des tréponèmes syphilitiques hébergés dans les tissus vivants. Des lapins reçurent dans chaque testicule  $0,5 \text{ cm}^3$  d'une émulsion homogène de syphiloïme testi-

(\*) Manuscrit reçu le 22 juillet 1960.

culaire (souche Gand). Il fut constaté que le nombre des tréponèmes subissait aussitôt après l'inoculation une chute intense, rapide, dans la proportion de 735 à 1, puis un accroissement progressif à partir du quatrième jour. Cette multiplication dure toute la période de l'incubation locale.

Plus récemment Cumberland et Turner [2] étudierent la multiplication des tréponèmes pâles chez les lapins sains et immunisés. Le travail fut poursuivi en utilisant la souche Nichols.

Les auteurs constatèrent que, deux heures après l'inoculation intratesticulaire de 10 000 000 de spirochètes, on trouve une diminution de 90 p. 100 dans le nombre des organismes présents dans le testicule. Parallèlement à cette perte initiale il se produirait, selon une progression géométrique, une multiplication des tréponèmes et en cent huit heures (quatre jours et demi), on observe un décuplement des parasites, ce qui équivaut à une moyenne de trente-trois heures pour une simple division, chaque spirochète se partageant en deux.

Les auteurs pensent que les spirochètes émigrent aussitôt après l'inoculation vers le courant circulatoire sanguin et lymphatique, d'où la chute du taux parasitaire. Ils émettent l'hypothèse qu'ultérieurement les spirochètes repassent du sang dans les testicules.

Par ailleurs, étudiant parallèlement les animaux neufs et immuns, ils remarquent chez les uns et les autres le même comportement dans les deux heures qui suivent l'inoculation et vingt-quatre heures après. Mais, à partir de cinq jours et surtout du septième jour, les différences sont caractérisées, les spirochètes se multipliant chez les animaux sains, alors qu'ils disparaissent chez la majorité des animaux immuns.

Nous avons entrepris une série de recherches pour suivre par des examens très rapprochés le devenir d'une émulsion tréponémique inoculée, soit dans le testicule, soit par voie intradermique, utilisant essentiellement la souche Nichols, mais aussi la souche Gand. L'étude a été faite au fond noir, par frottis et par méthode de coupes histologiques.

### I. — ÉTUDE AU FOND NOIR.

Des séries de lapins sont inoculées avec un matériel contenant la souche Nichols. Ce matériel était très riche ; il représentait une émulsion contenant une moyenne de 15 tréponèmes par champ d'immersion au fond noir et le volume de l'inoculat était de 1 cm<sup>3</sup> introduit au centre des testicules. Ainsi ont été étudiés 40 lapins.

Des ponctions furent faites de façon régulière, débutant deux heures après l'inoculation intratesticulaire et poursuivies jusqu'à quatorze jours. Plusieurs testicules furent ponctionnés deux heures et dix-huit

heures après l'inoculation. On ne retrouvait qu'un nombre infiniment réduit de tréponèmes. Pour un lapin, un seul parasite fut observé sur plusieurs lames et sur de nombreux champs microscopiques. On n'observait également aucune forme anormale. A vingt-quatre heures, 4 lapins sont examinés sur plusieurs préparations. On ne note que quelques très exceptionnels spirochètes d'aspect typique, témoignant de l'apport fait la veille.

L'absence quasi totale de spirochètes fut observée sur tous les examens pratiqués trente-six heures après l'inoculation ; quarante-huit heures après, les testicules de 5 lapins furent ponctionnés et dans tous les cas on ne décela pas la présence de spirochètes, sauf chez l'un d'eux. On a pu, par contre, noter la présence de formes filamenteuses très fines, très mobiles, ondulées et attachées souvent à un grain.

Aux troisième et quatrième jours, les deux testicules de 10 lapins furent ponctionnés et, dans tous les cas, les examens furent concordants. Au fond noir, on ne voit plus que très exceptionnellement des spirochètes typiques. On observe, par contre, d'assez nombreuses granulations mobiles ou non, isolées ou suivies de filaments très fins, comportant deux ou trois tours de spires.

Les testicules de 6 lapins sont ponctionnés aux cinquième et sixième jours. On remarque dans toutes les préparations des spirochètes typiques, mais généralement très fins et courts.

Aux septième et huitième jours, à côté de spirochètes bien constitués se trouvent des formes très fines, les unes assez longues, les autres très courtes, constituées souvent par un grain et un filament avec deux tours de spires. Ces formes sont en général bien mobiles.

Dans les préparations du dixième et du onzième jours, alors que l'orchite aiguë est constituée, dominent des spirochètes bien normaux et bien mobiles ; cependant on trouve aussi des formes courtes, possédant le plus souvent un grain à une extrémité.

Enfin au quatorzième jour les lames contiennent essentiellement des spirochètes normaux. Néanmoins on trouve encore, à la ponction de l'orchite aiguë, des formes courtes, limitées à quelques tours de spires parfaitement marqués.

## II. — ETUDE SUR FROTTIS IMPRÉGNÉS A L'ARGENT.

Parallèlement à ces examens au fond noir d'autres lames subirent une imprégnation argentique et la lecture de ces préparations confirma en tous points les examens pratiqués à l'ultramicroscope : elle montra surtout le caractère très argentophile des granulations, suivies généralement d'un filament peu spiralé, prenant parfois faiblement l'argent.

*En résumé*, il résulte de ces recherches, que dès la deuxième heure après l'inoculation intratesticulaire d'une émulsion riche en tréponèmes, il se produit une chute brusque du matériel injecté.

Aux troisième et quatrième jours il y a un véritable *trou*, en ce sens que l'on ne peut retrouver que très difficilement, sur de nombreux examens, quelques très rares parasites normaux.

Mais vers les cinquième ou huitième jours, on remarque, à côté de la présence de spirochètes de morphologie habituelle, celle de parasites très fins et des formes courtes généralement constituées par un grain et un filament de deux ou trois tours de spire. On observe aussi des formes dont la finesse évoquerait l'idée d'une « ombre » de spirochètes.

### III. — COLORATION SUR COUPES.

Les testicules de nombreux lapins furent inoculés avec 1 cm<sup>3</sup> d'une émulsion très riche et l'ablation de chaque testicule a été effectuée dans des délais différents. Après fixation, des tranches

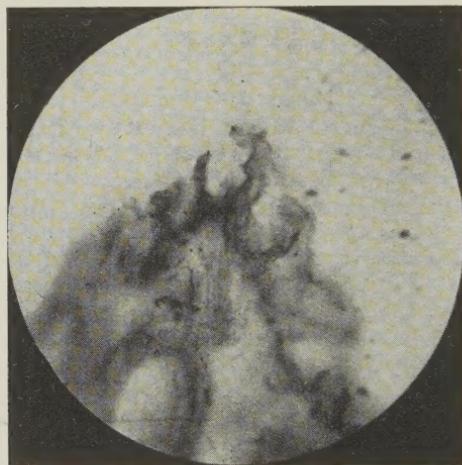


FIG. 1. — Coupe de testicule inoculé depuis quatre jours. Rares spirochètes normaux très granuleux, foyer de grains semblant provenir de la lyse des spirochètes d'apport, formes granulaires avec court filament. G. × 1 280 (examiner avec une loupe).

testiculaires furent mises en paraffine pour pratiquer des coupes en série et leur imprégnation argentique.

Les préparations montrent, vingt-quatre heures après l'inoculation, de très rares spirochètes normaux. On note aussi des grains argyrophiles avec des filaments spiralés.

Après l'inoculation intratesticulaire de quarante-trois heures, on ne perçoit aucun spirochète, sauf très rares exceptions.

L'aspect est à peu près le même quarante-huit heures après l'inoculation. À côté de très rares spirochètes normaux, on note de nombreux grains argyrophiles, souvent attachés à un filament légèrement spiralé.

Au troisième jour il est difficile de retrouver sur les coupes des spirochètes normaux. On repère surtout des aspects de parasites brisés et des grains parfois nettement plus argyrophiles que les filaments qui leur font suite. Six lapins examinés à cette date ont donné exactement la même lecture.

Dans les testicules prélevés au quatrième jour, les coupes montrent un nombre très réduit de spirochètes typiques, mais d'abondantes formations granulaires argyrophiles disséminées.

Les coupes du cinquième jour contiennent des tréponèmes normaux dans des travées intercellulaires ; mais on découvre en outre des foyers de petits tréponèmes attachés généralement à un grain argyrophile. On note aussi des formes très fines, granuleuses. Nos examens portent sur les deux testicules de cinq animaux différents.

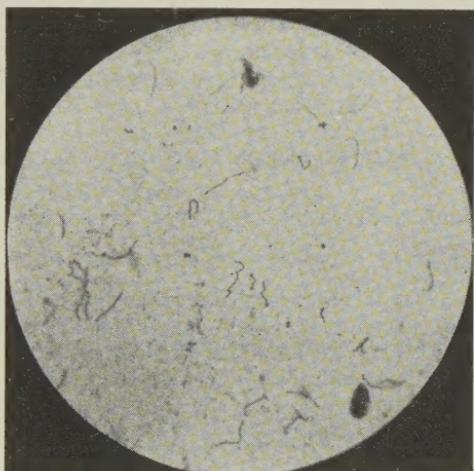


FIG. 2. — Frottis d'orchite à 11 jours. Souche Nichols. A côté de spirochètes normaux, formes en grains avec filament de deux ou trois tours de spire. Gr.  $\times 1\,280$ . (examiner avec une loupe).

Des spirochètes normaux sont retrouvés en abondance plus ou moins grande à sept jours, mais on observe aussi des aspects parasitaires très granuleux, poussiéreux et des formes courtes.

Les testicules infectés depuis neuf jours contiennent des spirochètes normaux, coexistant avec les parasites granuleux et des formes bien colorées, mais de très petite taille.

Lorsque l'orchite remonte à onze jours, les tréponèmes de morphologie normale voisinent avec des formes petites et des grains libres. La phystionomie de la préparation est un véritable échantillonnage de tréponèmes de toute taille.

Les testicules examinés par coupes au quatorzième jour offrent la phystionomie d'une orchite aiguë avec tréponèmes très nombreux,

coexistant d'ailleurs avec des formes granuleuses, longues et aussi avec des formes courtes.

Lorsque la coupe intéresse le syphilome qui s'est constitué, on trouve beaucoup de spirochètes en état de lyse avec des grains épars formant des plages poussiéreuses. Parfois on observe des spirochètes seulement représentés par une série de grains prenant l'argent et dessinant les spires d'un tréponème dont les parois ont disparu.

Si l'examen porte sur une orchite *résiduelle* de vingt jours, les spirochètes deviennent un peu moins abondants et ils sont granuleux.

Au trentième jour d'une telle orchite aiguë *en régression*, on ne trouve plus que de rares spirochètes typiques, mais des formes en débris et en grains.

*En résumé*, par la méthode des coupes on retrouve les mêmes notions que par l'examen au fond noir. Très vite après l'inoculation intratesticulaire, les tréponèmes disparaissent pour réapparaître normaux et abondants vers les septième et huitième jours.

#### IV. — EXAMEN DES INTRADERMO-INJECTIONS.

Les inoculations sont faites soit avec la souche Nichols, soit avec la souche Gand.

*Souche Nichols* : Dès la vingt-quatrième heure on ne retrouve qu'un nombre très réduit de spirochètes au point inoculé. Aucune multiplication ne se produit ; l'animal meurt le cent dixième jour sans présenter aucune lésion, mais le test de Nelson est de 52 p. 100.

Chez un autre lapin les intradermo-injections biopsierées vingt heures après soulignent quelques spirochètes très fins, granuleux, en très petit nombre. A partir du troisième jour les examens biopsiques ne montrent plus aucun tréponème et il n'y a aucune évolution lésionnelle.

Même résultat négatif chez un lapin inoculé en huit points différents avec la souche Nichols par voie intradermique. Les spirochètes disparaissent dès les premiers jours, aucune évolution apparente ne se constitue. L'animal, cependant, au soixante et unième jour présente un test à 78 p. 100.

Ainsi la souche Nichols capable de syphiliser l'animal par voie intradermique n'a pu néanmoins provoquer une lésion sur la région dorsale. Il faut remarquer que cette souche, entretenue au laboratoire depuis des années par passages réguliers intratesticulaires donnant des orchites aiguës en huit à douze jours, a grandement diminué ses propriétés dermotropes. Aussi avons-nous utilisé comparativement la souche Gand.

*Souche Gand* : Nous avons employé une émulsion provenant d'un syphilome d'un lapin inoculé avec un matériel souris. Après n'avoir retrouvé aucun spirochète typique pendant les onze premiers jours au point d'inoculation intradermique, un infiltrat s'est constitué conte-

nant des spirochètes normaux et un syphilome était formé au cinquantième jour.

Lorsque l'inoculation intradermique est effectuée par greffon d'un fragment de syphilome riche en tréponèmes, on retrouve ceux-ci à l'intérieur du greffon, mais dans les régions périgreffales, on n'observe sur les coupes la présence des spirochètes qu'à partir du vingt-deuxième jour. Les parasites apparaissent progressivement et on constate surtout la présence de formes très petites et fines, certaines représentées par un granule et un filament légèrement spiralé. Le syphilome est constitué en quarante-cinq à cinquante jours.

Notons que l'évolution peut avorter en même temps que les greffons se résorbent.

#### V. — INCUBATION LOCALE CHEZ LES ANIMAUX IMMUNS.

Nous avons pu confirmer les remarques de Cumberland et Turner sur le fait que, chez les animaux immuns, l'inoculation des tréponèmes présente, comme chez les animaux neufs, une disparition rapide du matériel injecté dès les premières heures après la pénétration intratesticulaire.

Le contrôle a été fait, huit, vingt-quatre, quarante-deux, quarante-huit, soixante-six heures et quatre jours après l'inoculation.

Dans les jours consécutifs et jusqu'au seizième jour, nous n'avons constaté aucune multiplication nouvelle des spirochètes comme c'est le cas chez le lapin neuf.

Les résultats sont les mêmes chez un animal immun injecté par voie intradermique avec une souche homologue.

Nous retrouvons ainsi tous les détails d'un précédent travail [3] dans lequel nous montrions que les tissus d'un animal immun refusent de se laisser pénétrer par les parasites d'un nouvel apport et ne dressent cependant aucun des obstacles habituels pour limiter le foyer infectieux. Aussi invoquions-nous une *refus cellulaire* à l'égard de la nouvelle infection expérimentale alors qu'il n'existe aucun phénomène histologique capable d'expliquer la non-multiplication des tréponèmes.

#### VI. — L'AVENIR DES TRÉPONÈMES MORTS INJECTÉS DANS LE TESTICULE.

On pouvait se demander quel est le comportement local des tréponèmes tués avant d'être injectés à l'intérieur de la masse testiculaire. Une émulsion tréponémique provenant d'une orchite très riche en parasites fut chauffée à 56° deux fois de suite pendant une heure et ensuite injectée à des lapins neufs.

Nous avons constaté la même disparition rapide du matériel inoculé examiné dès la quatrième heure jusqu'au quatrième jour. Les spirochètes tués retrouvés en nombre très réduit à la quatrième et à la sixième heure n'étaient plus décelables ensuite.

La disparition des parasites ne peut donc être considérée comme un phénomène lié à une activité vitale.

#### DISCUSSION.

Les protocoles rapportés confirment la profonde différence qu'il y a dans l'emploi du terme incubation, si l'on veut entendre sans précision spéciale l'incubation générale de l'infection syphilitique et l'incubation locale de la lésion au point inoculé.

Si l'on étudie en série le devenir des spirochètes injectés en un point donné, on se trouve en présence de grandes difficultés d'interprétation. Les tréponèmes, en effet, ne restent pas au point du dépôt, ils gagnent des voies éfférentes sanguines et lymphatiques, et sans doute la hyaluronidase contenue dans les émulsions testiculaires y contribue-t-elle.

Cette disparition importante commence dès les premières heures et vers le troisième jour, il est difficile de retrouver des parasites qui réapparaissent abondants en six, sept ou huit jours.

Comment interpréter cette multiplication des spirochètes ? Certes, la division isotypique ou anisotypique permet d'en fournir l'explication, sans invoquer un retour des tréponèmes passés en circulation vers le point inoculé, ce qui paraît difficilement acceptable.

Nous ne voulons pas entrer ici dans le débat confus des auteurs qui ont envisagé les différents modèles de reproduction. A vrai dire, ils ont étudié surtout les tréponèmes cultivables, comme le Reiter, et ont fourni des images séduisantes de formation kystique, granulaire sans pouvoir donner une affirmation.

En nous basant seulement sur les constatations faites dans la longue suite d'animaux en expérience, il est possible d'avancer quelques suggestions.

Lorsque les spirochètes disparaissent du point inoculé dans les heures qui suivent l'apport d'une émulsion virulente, on remarque cependant la présence de granulations argyrophiles, posant le problème d'une forme granulaire du parasite, de leur provenance à partir des « grains » issus du corps des spirochètes lysés ou d'une division anisotypique.

Progressivement on voit apparaître, tant au fond noir que sur les lames colorées ou dans les coupes, des formes essentiellement constituées par un granule suivi d'un court filament comportant deux ou trois tours de spire sculétement. Sur les lames imprégnées à l'argent, les filaments sont parfois très faiblement argentophiles par opposition aux granules très fortement imprégnés. Ces formations se retrouvent encore longtemps associées à la présence de spirochètes normaux.

Notons aussi l'existence de formes extrêmement fines, véritables « ombres » de spirochètes, indépendantes de toute formation granulaire. Ces aspects nous rappellent ceux que nous avons observés lorsqu'on inocule à un lapin un matériel virulent de souris, avant qu'un syphilome ne se constitue et contienne des spirochètes de type normal. Nous avons signalé ce fait antérieurement [4] en rappelant la dénomination de *formes métacycliques* donnée par Leishman, puis par Brumpt, à des aspects transitoires du récurrent. Ces spirochètes n'apparaissent que de façon passagère et font place progressivement aux parasites typiques.

Sans vouloir, bien entendu, inférer de nos constatations un cycle particulier du tréponème, peut-être est-il difficile d'interpréter la multiplication des parasites subsistant après la phase de disparition par l'exclusive division des spirochètes ?

D'autre part, la présence de granulations très argentophiles suivies d'un fin filament à deux ou trois tours de spire s'imprégnant très peu à l'argent, pose à nouveau le problème du *granule spirochétogène* tel qu'il a été défini par Seguin et par Mollinedo [5] dans sa thèse de doctorat ès sciences. Ayant longtemps et personnellement travaillé avec ce dernier, l'un de nous estime que, pour certaines formes au moins, l'assimilation peut être faite avec un granule spirochétogène légitime, représentant une forme évolutive de multiplication. On sait que pour Seguin elle naîtrait par division anisotypique dans des conditions de souffrance. Nous ne poursuivons pas l'étude biologique de cet organite, ce qui nous entraînerait bien loin de notre sujet.

Dans l'étude du comportement des spirochètes inoculés, il convient d'envisager la qualité des tissus récepteurs. Levaditi, Vaisman et Schoen [6] avaient été amenés à distinguer les tissus tréponémophiles par opposition aux tissus tréponémophobes. Le névraxe n'est pas seul de cette catégorie. Le ganglion lymphatique, le muscle ne se prêtent pas à la constitution d'un processus spécifique local après inoculation d'une souche virulente *in situ*. Cependant, si le ganglion ne permet pas la végétabilité du tréponème directement apporté, ce dernier n'est pas détruit et l'animal est en état de syphilis inapparente.

Enfin, il faut tenir compte, dans la durée de l'incubation locale avant l'apparition de la lésion apparente, du fait que les tréponèmes ont été transportés dans un milieu nouveau pour eux. Metchnikoff et Roux [7] avaient bien montré, il y a longtemps, qu'un virus syphilitique donne un chancre précoce en sept jours après avoir subi onze passages sur *M. rhesus*.

#### CONCLUSIONS.

Les auteurs montrent que si la syphilis ne comporte pas d'incubation générale, par contre il est une incubation locale couvrant la période s'étendant jusqu'à l'apparition de l'accident anatomique au point de pénétration.

Ils suivent, par des examens successifs très rapprochés, le devenir d'une émulsion tréponémique inoculée soit dans le testicule, soit dans le derme.

L'étude a été faite au fond noir, par frottis colorés et par la méthode de coupes histologiques.

Dès la deuxième heure après l'inoculation intratesticulaire d'une émulsion riche en tréponèmes, il se produit une chute brusque du matériel injecté. Les parasites disparaissent presque complètement le troisième jour. Mais on observe de nombreuses granulations, mobiles ou non, isolées ou suivies de filaments à deux ou trois tours de spire. Parfois se trouvent des spirochètes d'une particulière ténuité, rappelant les formes métacycliques décrites par Leishman et Brumpt pour le récurrent. Ces formes se remarquent aussi lorsque vers le sixième ou huitième jour réapparaissent des spirochètes de morphologie normale.

Parallèlement des frottis imprégnés à l'argent confirment en tous points les précédentes observations effectuées sur 40 lapins.

Par la méthode des coupes on retrouve les mêmes notions.

Chez les animaux immuns la disparition des tréponèmes s'effectue dans les mêmes délais que chez l'animal neuf, mais aucune réapparition ne se produit.

La disparition s'observe également si le matériel injecté est préalablement tué : on ne peut donc considérer le phénomène comme un acte vital.

La réapparition des tréponèmes après leur éclipse pose un difficile problème : les auteurs émettent l'hypothèse que les divisions isotypiques ou anisotypiques ne seraient peut-être pas seules à invoquer. On est frappé par l'abondance des formes granulaires si souvent décrites, suivies d'un filament très court à deux ou

trois tours de spire, et par la présence de types rappelant l'aspect des *spirochètes métacycliques* de Brumpt.

Enfin, dans quelques cas on peut assimiler au *granule spirochétogène* certaine morphologie caractérisée par la très faible argyrophilie d'un court filament contrastant avec la forte imprégnation du grain.

## SUMMARY

### PROBLEMS OF THE LOCAL INCUBATION OF *Spirocheta pallidum* IN RABBIT SYPHILIS.

The authors show that there is no systemic incubation in syphilis, but a local incubation exists, extending until the appearance of the anatomical accident at the penetration site.

They follow, by means of very frequent examinations, the fate of a *Treponema* emulsion inoculated into the testis or into the skin. The study is carried out by means of a darkfield microscope, stained smears and histological sections.

Two hours after intratesticular inoculation, the inoculated material suddenly decreases ; the parasites disappear almost completely on the third day ; but it is possible to notice numerous granulations. mobile or immobile, isolated or accompanied by spiral filaments. Sometimes it is also possible to see extremely small spirochaetes resembling the metacyclic forms of recurrent spirochaetes described by Leishman and Brumpt.

Silver impregnated smears confirm these observations.

The histological sections technique also yields the same results.

In immune animals the disappearance of the *Treponema* is realized within the same time as in non immune animals, but no reappearance is observed.

The disappearance also occurs with inactivated material ; therefore the phenomenon cannot be considered as being due to vital activity.

The appearance of the *Treponema* after the eclipse phase raises a difficult problem. The authors suggest that isotypic and anisotypic divisions might not alone be involved. The great number of granular forms possessing a very short spiral filament and the presence of forms resembling the Brumpt's metacyclic *Spirochaetae* are striking.

Certain forms at least, characterized by a slight argyrophily of the filament and the strong impregnation of the granules, very much resemble the spirochetogeneous granule.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BESSMANS (A.) et HEALST (J. VAN). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 240.
- [2] CUMBERLAND (Mary C.) et TURNER (T.). *Amer. J. Syphil.*, 1949, **33**, 201.
- [3] GASTINEL (P.), COLLART (P.), VAISMAN (A.) et DUNOYER (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 677.
- [4] GASTINEL (P.), VAISMAN (A.) et DUNOYER (F.). *Ann. Derm. Syphil.*, 1955, **82**, 140.
- [5] MOLLINEDO (R.). Essai sur le cycle évolutif des spirochètes. *Thèse doct. ès sci.*, Paris, 1941.
- [6] LEVADITI (C.), VAISMAN (A.) et SCHOEN. *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, **56**, 81.
- [7] METCHNIKOFF (E.) et ROUX. *Ann. Inst. Pasteur*, 1906, **86**, 784.

---

# ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE, CHROMATOGRAPHIQUE ET IMMUNOLOGIQUE DES ANTIGÈNES DE CANDIDA ALBICANS.

## CARACTÉRISATION DE DEUX ANTIGÈNES SPÉCIFIQUES

par J. BIGUET, R. HAVEZ, TRAN VAN KY et R. DEGAEY (\*).

(*Laboratoires de Parasitologie* [professeur J. BIGUET]  
*et de Biochimie pathologique* [professeur G. BISERTE]  
*de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Lille*)

Nous avons pu montrer dans nos travaux préliminaires [1 et 2] que les techniques de diffusion en gélose et d'immuno-électrophorèse étaient aisément applicables à l'étude des fractions antigéniques des levures du genre *Candida*. Dans le présent travail nous nous efforçons de préciser les antigènes spécifiques de *Candida albicans* en associant les méthodes électrophorétique, chromatographique et immunologique.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

### A. — SOUCHES UTILISÉES (1).

Les souches de levures suivantes sont utilisées après quarante-huit heures de culture sur milieu solide glucosé de Sabouraud :

- 3 souches de *C. albicans*,
- 2 souches de *C. tropicalis*,
- 2 souches de *C. zeylanoides*,
- 2 souches de *C. krusei*,
- 1 souche de *C. brumpti*,
- 1 souche de *C. macedoniensis*,
- 2 souches de *C. pseudotropicalis*,
- 2 souches de *C. stellatoidea*.

(\*) Manuscrit reçu le 20 juillet 1960.

(1) Ces souches ont été obtenues à l'Institut Pasteur de Paris et au Centraal Bureau voor Schimmelcultures de Baarn.

Les 7 premières espèces appartiennent à des groupes différents de la classification fondamentale de Langeron et Guerra [9], fondée essentiellement sur l'étude des fermentations et de l'assimilation des sucres.

Quant à *C. stellatoidea* (Jones et Martin [7]), elle est considérée comme une espèce distincte de *C. albicans* par Langeron et Guerra [10], en raison de son absence de production d'acide à partir du saccharose, de sa faible production de chlamydospores et de son peu de pouvoir pathogène pour le lapin. Winter et Foley [17] étudient 195 souches répondant aux caractères de fermentation de *C. albicans* et de *C. stellatoidea* (fermentation du glucose et du maltose). Ils observent des variations importantes des trois caractères considérés par Langeron et Guerra selon les souches de *C. albicans* utilisées. Ces résultats les amènent à considérer *C. stellatoidea* comme l'une des multiples variantes de *C. albicans* avec qui elle doit tomber en synonymie.

Les résultats de ces derniers auteurs confirmés en 1955 par les données immunologiques réalisées par Jonsen [8], sont contestés, dans les structures antigéniques établies tout récemment par Tsuchiya et coll. [16] à l'aide de méthodes d'agglutination sur lames. Étudié par ces techniques, *C. tropicalis* possède 6 antigènes communs avec *C. albicans*, alors que *C. stellatoidea* semble moins proche de *C. albicans* et ne présente que 5 antigènes communs à cette espèce.

#### B. — PRÉPARATION DES ANTIGÈNES.

Dix grammes de levures sèches, préalablement lavées à l'acétone glacée et lyophilisées, sont broyés mécaniquement pendant une heure avec de la poudre de verre. Une triple extraction est pratiquée avec 20 ml d'eau distillée. Après centrifugation réfrigérée à 10 000 tours par minute, les surnageants sont rassemblés et complétés exactement à 100 ml. Les protéines totales de chaque lot d'antigène sont dosées par la méthode du biuret. Après quoi chaque lot est lyophilisé.

#### C. — PRÉPARATION DES IMMUNSÉRUMS.

Les antisérum de lapin sont préparés par deux méthodes différentes : injections hebdomadaires par voie sous-cutanée d'une solution aqueuse de 30 mg d'antigène lyophilisé et incorporé à l'adjuvant de Freund [5], injections intraveineuses répétées d'une solution d'antigène préparée selon la méthode décrite par Porter [12].

Quatorze animaux différents sont soumis à ces méthodes d'immunisation pour la préparation de l'immunsérum *C. albicans*.

L'immunisation de l'animal est suivie par titrage périodique du sérum prélevé. Les antisérum sont titrés par rapport à une solution d'antigène de *C. albicans* renfermant 1 g p. 1 000 de protéines et sont retenus lorsqu'ils précipitent à une dilution de 1/128.

#### D. — MÉTHODES D'ÉTUDE ET DE FRACTIONNEMENT DE L'ANTIGÈNE.

Diverses méthodes d'électrophorèse de zone sont utilisées : électrophorèse en gélose et en gel d'amidon. Nous réalisons d'autre part un fractionnement de l'antigène par le sulfate d'ammonium et par chromatographie sur D. E. A. E.-cellulose.

1<sup>o</sup> *Microélectrophorèse en gélose* (tampon véronal de pH 8,2, force ionique 0,1).

Une séparation satisfaisante est obtenue en cinq heures trente sous un potentiel de 20 volts aux extrémités des lames ( $7,5 \times 2,5$  cm). Après fixation chimique les protéines sont révélées par le vert de lissamine, les glycoprotéides par la technique à l'acide périodique-réactif de Schiff [3], les lipoprotéides par le noir Soudan [15].

2<sup>o</sup> *Immuno-électrophorèse en gélose* (tampon véronal de pH 8,2, force ionique 0,1) [6].

Après séparation électrophorétique, la révélation des diagrammes en gélose est obtenue à l'aide des immunsérum de lapin. Cette méthode, d'une grande spécificité, permet de dénombrer les antigènes entrant dans la constitution de chacune des fractions électrophorétiques. La saturation préalable des anticorps de l'immunsérum utilisé par l'antigène étudié situe exactement la position des antigènes spécifiques au sein du diagramme global de l'espèce. Elle permet ainsi de définir les rapports antigéniques des différentes espèces de *Candida* étudiées. Cette méthode reste toutefois tributaire de la qualité de l'immunsérum utilisé et ne peut révéler qu'un nombre mineur de constituants.

3<sup>o</sup> *Electrophorèse en gel d'amidon*. — Nous utilisons un appareil d'électrophorèse vertical [14] et le système tampon discontinu décrit par Poulik [13]. Cette méthode permet de réaliser l'étude comparative de 8 échantillons en seize heures sous un potentiel de 100 volts aux extrémités du gel. Les fractions séparées sont révélées par l'amido-schwarz.

4<sup>o</sup> *Fractionnement de l'antigène par le sulfate d'ammonium*. — Les cinq fractions (F1, F2, F3, F4 et F5) sont obtenues successivement à 30, 50, 60, 80 et 100 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Le fractionnement est réalisé à pH 7 et à 20° C. Chaque fraction est dialysée trois jours contre eau distillée, puis lyophilisée.

5° *Chromatographie sur colonne D. E. A. E.-cellulose.* — La diéthyl-amino-éthyl cellulose (D. E. A. E.-cellulose) est préparée suivant la technique de Peterson et Sober [11]. L'élution est pratiquée par la méthode de Fahey [4] avec un gradient de pH et de force ionique réalisé en tampon phosphate. Des fractions de 4 ml sont recueillies avec un collecteur automatique de fractions. Ces éluats sont mesurés par spectrophotométrie à 270 m $\mu$ . Les fractions sont lyophilisées après dialyse contre eau distillée.

## RÉSULTATS

### A. — ETUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES ANTIGÈNES DE *Candida albicans*.

L'électrophorèse en gélose pratiquée sur l'antigène total (fig. 1). ne permet pas d'obtenir une résolution satisfaisante. Les fractions

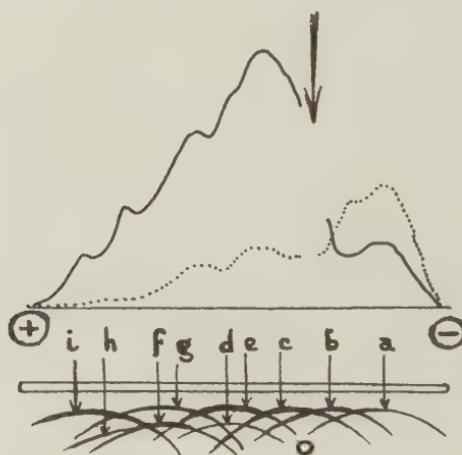


FIG. 1. — Courbes densitométriques des protéinogramme (trait plein) et glycoprotéinogramme (trait pointillé) en gélose de l'antigène de *C. albicans*. Le diagramme immuno-électrophorétique correspondant obtenu avec un sérum de lapin anti-*C. albicans* montre 9 arcs de précipitation.

protéiques majeures se situent au voisinage du versant anodique du godet de dépôt. Ces fractions se colorent faiblement par la méthode à l'acide périodique-réactif de Schiff. On décèle en outre, dans cette zone, une faible trace de constituants de nature lipoprotéique. Deux fractions mineures plus rapides et de nature protéique s'individualisent dans la partie anodique extrême du

diagramme. La zone cathodique du diagramme en gélose est occupée essentiellement par deux fractions mineures dont la richesse en glycoprotéines est assez caractéristique (fig. 1). Ce diagramme révélé par l'immunsérum homologue montre 9 arcs de précipitation différents (fig. 1). Nous les dénommons dans l'ordre alphabétique, de la zone cathodique à l'extrémité anodique du diagramme.

L'électrophorèse en gel d'amidon réalisée sur l'antigène total

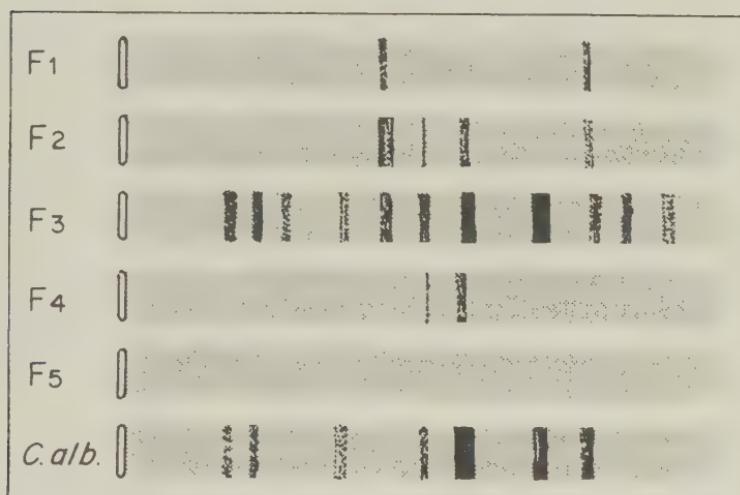


FIG. 2. — Schéma des électrophorèses en gel d'amidon (appareil vertical) révélées à l'amido-schwarz réalisées avec l'antigène total de *C. albicans* (*C. alb.*) et les fractions précipitées pour des concentrations en sulfate d'ammonium de 30 p. 100 de saturation (F1), 50 p. 100 (F2), 60 p. 100 (F3), 80 p. 100 (F4) et 100 p. 100 (F5). La plupart des antigènes précipitent entre 50 et 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium et cette fraction s'enrichit en composants mineurs non révélés sur le diagramme de l'antigène total.

permet de révéler sept fractions différentes, les constituants majeurs occupant ici encore la partie moyenne du diagramme (fig. 2).

#### B. — ETUDE DES FRACTIONS OBTENUES PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM.

Le fractionnement par augmentation progressive de la concentration en sulfate d'ammonium tel que nous le réalisons donne des précipités de constitution encore fort complexe. Leur étude immuno-électrophorétique est rapportée dans la figure 3. On cons-

tate aisément un chevauchement notable des zones de précipitation de plusieurs constituants. La totalité des divers antigènes est

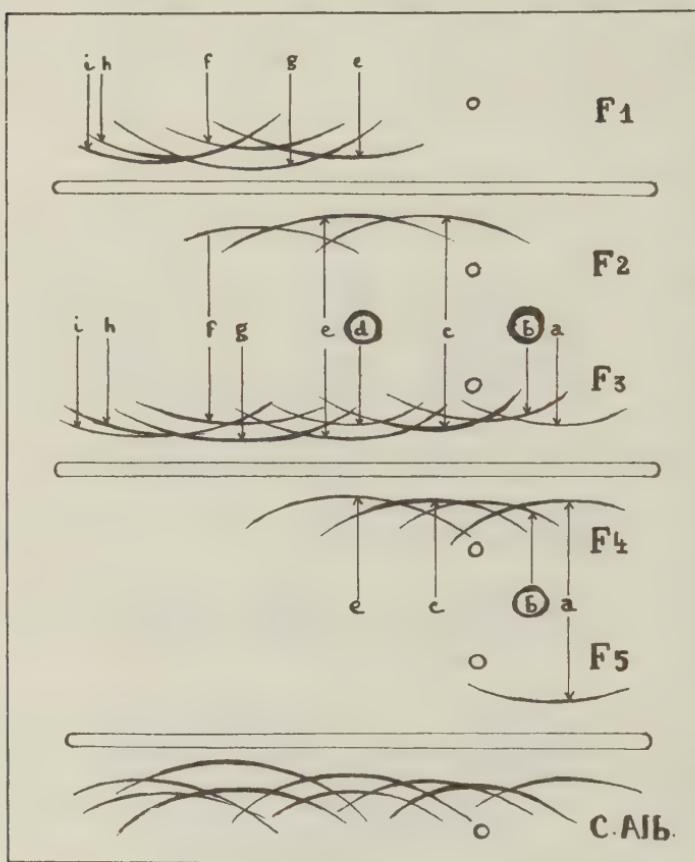


FIG. 3. — Etude immuno-électrophorétique en gélose de l'antigène de *C. albicans* (*C. Alb.*) et des fractions précipitées pour des concentrations progressives de la solution en sulfate d'ammonium. F1, 30 p. 100 de saturation ; F2, 50 p. 100 ; F3, 60 p. 100 ; F4, 80 p. 100 et F5, 100 p. 100. Les antigènes spécifiques *b* et *d* sont marqués d'un cercle et se localisent dans les fractions 3 et 4.

caractérisée dans le précipité obtenu entre 50 et 60 p. 100 de saturation (fraction 3). Toutefois les fractions précipitées à 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium sont particulièrement riches en constituants de nature glycoprotéique, comme le démontre aisément l'étude électrophorétique avec révélation par l'acide perio-

dique-réactif de Schiff et le dosage des hexoses [méthode à l'orcinol] (tableau I).

TABLEAU I. — Taux d'hexoses (pourcentage du poids sec) des fractions obtenues par relargage au sulfate d'ammonium de l'antigène de *C. albicans* (dosage par la méthode à l'orcinol).

CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM				
30 p. 100 4,1	50 p. 100 5,4	60 p. 100 16,6	80 p. 100 5,9	saturation 0,6

La séparation électrophorétique obtenue dans l'étude des fractions ainsi préparées est nettement plus satisfaisante que dans l'étude réalisée sur l'antigène total. La fraction 3 notamment se montre constituée de 6 pics d'absorption parfaitement individualisés sur le protéinogramme en gélose. En gel d'amidon cette même fraction permet de révéler 11 composants électrophorétiquement différents (fig. 2).

Le fractionnement ainsi réalisé conduit donc à un enrichissement notable de la préparation en certains constituants mineurs précipités sélectivement entre 50 et 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium et qui ne peuvent être révélés dans le diagramme obtenu à partir de l'antigène total.

#### C. — CARACTÉRISATION DES COMPOSANTS ANTIGÉNIQUES SPÉCIFIQUES DE L'ESPÈCE *C. albicans*.

L'existence de composants antigéniques spécifiques de l'espèce *Candida albicans* peut être démontrée en saturant les anticorps de l'immunsérum anti-*C. albicans* à l'aide des antigènes lyophilisés préparés à partir de chacune des autres espèces étudiées.

Aucune préparation des 7 espèces étudiées ne contient la totalité des déterminants antigéniques de *C. albicans* (fig. 4). L'espèce antigéniquement la plus voisine est représentée par *C. stellatoidea* qui contient 7 fractions immunologiquement identiques. Seuls les arcs *b* et *d* sont encore visibles dans le diagramme électrophorétique de l'antigène *C. albicans* révélé par son antisérum homologue épuisé avec l'antigène de *C. stellatoidea*.

Les constituants *e* et *i* de *C. stellatoidea* révélés par l'immunsérum anti-*C. albicans* possèdent, malgré leur identité antigénique avec les constituants qui leur correspondent chez *C. albicans*, un comportement électrophorétique légèrement différent. Les arcs ont en effet dans les diagrammes immuno-électrophorétiques un aspect bifide ou nettement dédoublé. L'utilisation de cet immunsérum épuisé par l'antigène *C. stellatoidea* permet de localiser aisément les constituants spécifiques *b* et *d* au sein des fractions

obtenues par relargage au sulfate d'ammonium. La fraction 3 renferme ces deux antigènes, la fraction 4, beaucoup moins complexe dans sa composition, renferme uniquement le constituant *b*.

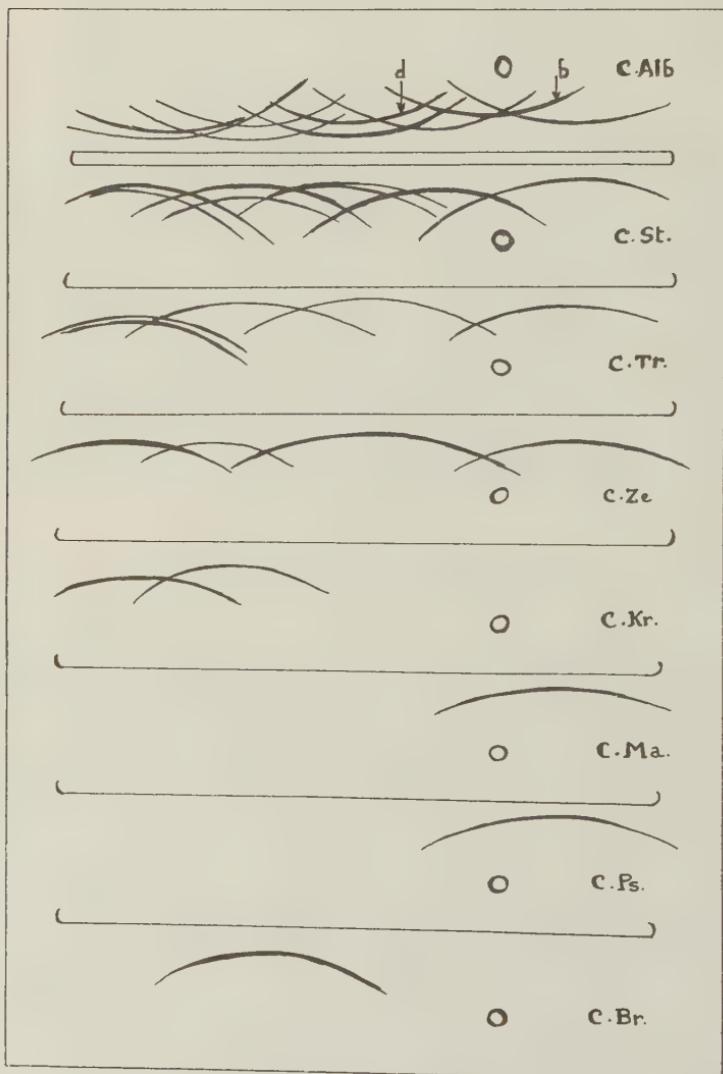


FIG. 4. — Etude immuno-électrophorétique en gélose des antigènes de 8 espèces de *Candida* à l'aide d'un sérum de lapin anti-*C. albicans*. Les antigènes communs à ces espèces et à *C. albicans* sont révélés dans ces diagrammes.

D. — ESSAI DE PURIFICATION DES ANTIGÈNES SPÉCIFIQUES  
DE *C. albicans* PAR CHROMATOGRAPHIE SUR D. E. A. E.-CELLULOSE.

La localisation des antigènes spécifiques au sein de la fraction la plus hétérogène obtenue par relargage au sulfate d'ammonium

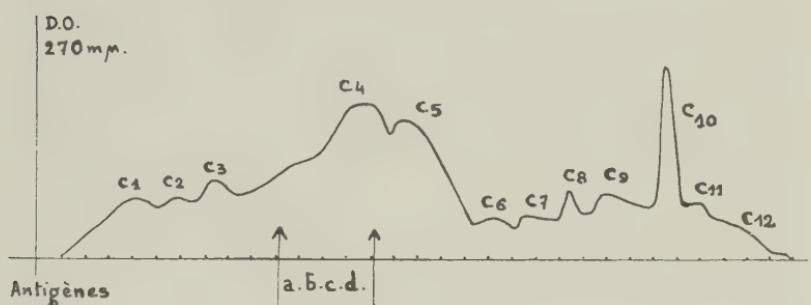


FIG. 5. — Séparation chromatographique sur D. E. A. E.-cellulose de l'antigène de *C. albicans*. Les antigènes spécifiques *b* et *d* se localisent dans la fraction C4.

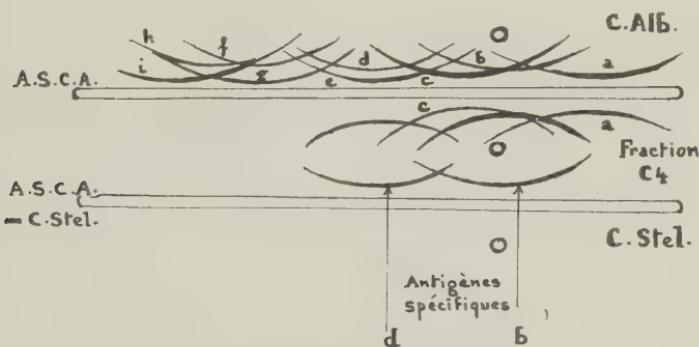


FIG. 6. — Etude immuno-électrophorétique en gélose de la fraction C4 obtenue par chromatographie sur D. E. A. E.-cellulose. L'utilisation de l'immunsérum *C. albicans* et du même antisérum épuisé par l'antigène de *C. stellaloidea* permet de préciser la position des antigènes spécifiques de *C. albicans* (arcs de précipitation de *b* et *d*).

nous a amenés, pour tenter leur isolement, à recourir à d'autres méthodes de fractionnement.

La fraction obtenue entre 50 et 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est lyophilisée puis soumise à une séparation chromatographique sur D. E. A. E.-cellulose. La courbe d'élution

obtenue à 270 m $\mu$  est représentée dans la figure 5. Le pic C4 renferme les deux antigènes *b* et *d*, ainsi que deux autres constituants que nous pouvons assimiler aux fractions *a* et *c*. Le pic C5 qui lui fait suite ne renferme que le constituant *a*.

L'étude de la fraction C4 par la méthode d'Ouchterlony à l'aide des immunsérum anti *C. albicans*, anti *C. stellatoidea*, anti *C. tropicalis*, anti *C. zeylanoides*, anti *C. krusei*, anti *C. pseudotropicalis* permet de démontrer l'existence dans cette préparation d'un antigène commun aux espèces *C. albicans*, *tropicalis*, *zeylanoides*, *stellatoidea* et *pseudo-tropicalis* (antigène *a*). Un second antigène est particulier aux espèces *albicans* et *stellatoidea* (antigène *c*). Seul *Candida albicans* possède les antigènes *b* et *d*. Ces résultats sont confirmés par l'étude immuno-électrophorétique de cette préparation (fig. 6).

#### E. — DISCUSSION DES RÉSULTATS ET RÉFLEXIONS SUR LES POSSIBILITÉS ET LES LIMITES DES TECHNIQUES UTILISÉES SUR DU MATÉRIEL PARASITAIRE.

L'association de techniques de fractionnement des protéines (électrophorèse, chromatographie et immuno-électrophorèse) nous permet de caractériser avec les immunsérum utilisés 9 fractions antigéniques chez *Candida albicans* (2), l'épuisement des immunsérum anti-*C. albicans* par les antigènes de quelques *Candida* judicieusement choisis a montré que deux de ces fractions sont spécifiques de l'espèce.

Ces résultats diffèrent de ceux de Tsuchiya et coll. [16]. Par ces méthodes d'agglutination, ces auteurs mettent en évidence chez *C. albicans* 7 antigènes, dont l'un est spécifique. Toutefois l'immunisation qu'ils réalisent par des levures entières injectées par voie veineuse chez l'animal est déjà susceptible de fournir une première explication des divergences obtenues dans les résultats expérimentaux. Les méthodes d'étude de l'antigène que nous utilisons reposent en outre sur des bases physico-chimiques diffé-

(2) Dans nos travaux préliminaires de 1959 [1, 2] 5 fractions antigéniques seulement avaient été détectées, ce qu'explique l'immunisation insuffisante des lapins donneurs d'immunsérum. Par ailleurs, la souche de *C. brumpti* dont nous disposions avait été accidentellement souillée par *C. albicans*. Pour ces raisons, les résultats de ce travail sont difficilement comparables à ceux présentés aujourd'hui. Il convient d'ailleurs de rappeler que la seule ambition de ces deux notes était de préciser l'intérêt éventuel de l'emploi des techniques immuno-chimiques modernes dans l'étude des fractions antigéniques des champignons pathogènes : nos conclusions encourageantes ont été largement justifiées depuis et peuvent même s'étendre au matériel helminthologique.

rentes. A la spécificité immunochimique s'ajoute, en effet, un fractionnement de base réalisé par l'électrophorèse. Il peut apporter dans l'étude d'un mélange antigénique aussi complexe une séparation fondée à la fois sur la composition chimique des antigènes et même sur leur taille moléculaire pour l'électrophorèse en gel d'amidon ou pour la diffusion au sein du milieu gélose.

Toutes ces méthodes suggèrent avec force l'étroit apparentement de *C. albicans* et *C. stellatoidea*, tandis que la structure antigénique de *C. tropicalis* semble plus éloignée de ces deux espèces.

La préparation des antigènes spécifiques de *C. albicans* nécessite le couplage de plusieurs méthodes de fractionnement (relargage au sulfate d'ammonium et chromatographie) et ne nous conduit jusqu'alors qu'à l'obtention d'une fraction polyspécifique groupant un antigène commun à *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. zeylanoides*, *C. pseudotropicalis* et *C. macedoniensis*, un second antigène commun à *C. stellatoidea* et *C. albicans* et les deux antigènes spécifiques de *C. albicans*. Notre expérience est maintenant suffisante pour porter un premier jugement sur l'intérêt de ces méthodes dans l'étude d'un matériel parasitaire. Il ne semble pas qu'elles puissent avoir de larges applications au diagnostic biologique de ces parasites. En effet, elles entraînent des manipulations longues et délicates et nécessitent la préparation de quantités suffisantes d'antigènes. Il est cependant indiscutable que leur mise en œuvre peut conduire à la caractérisation précise et à l'isolement de fractions antigéniques spécifiques, par conséquent à la préparation d'antigènes et d'allergènes de grande valeur. Il se confirme également qu'elles sont susceptibles de fournir des arguments taxonomiques nouveaux. On peut supposer raisonnablement que l'étude de la nature et des propriétés de ces fractions peut contribuer à la connaissance de la pathogénie de ces affections parasitaires.

#### RÉSUMÉ.

L'extraction aqueuse de broyats cellulaires de levures du genre *Candida* conduit à la préparation d'un antigène de nature protéique, riche en hexoses. La préparation obtenue à partir de *Candida albicans* cultivé quarante-huit heures sur milieu solide glucosé de Sabouraud est fractionnée par différentes méthodes d'électrophorèse de zone (électrophorèse en gélose et en gel d'amidon), précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur D. E. A. E.-cellulose. Sa structure antigénique déterminée par immuno-électrophorèse en gélose conduit à la description de neuf fractions dont deux sont spécifiques de l'espèce *C. albicans*. Le dénombrement des fractions antigéniques communes à *C. albicans* et à sept autres espèces de *Candida* est également réalisé. Nos

résultats rapprochent sur le plan antigénique *C. stellatoidea* de *C. albicans*, *C. tropicalis* de *C. zeylanoides* et distinguent nettement ces espèces de *C. krusei*, *C. brumpti*, *C. macedoniensis* et *C. pseudotropicalis*.

### SUMMARY

ELECTROPHORETIC, CHROMATOGRAPHIC AND IMMUNOLOGICAL STUDIES  
ON *Candida albicans*.

CHARACTERIZATION OF TWO SPECIFIC ANTIGENS.

By means of water extraction of ground *Candida*, the authors prepare a proteic antigen, rich in hexoses. The material obtained from a 48 hours culture of *C. albicans* on Sabouraud's solid glucose medium, is fractionated by means of various zone electrophoresis methods (gel and starch electrophoresis), precipitation with ammonium sulfate and chromatography on D. E. A. E-cellulose. Its antigenic structure, as demonstrated by gel immunoelectrophoresis, shows nine fractions, two of which are specific for *C. albicans*. The antigenic fractions common to *C. albicans* and seven other *Candida* species are also demonstrated : *C. stellatoidea* is antigenically related with *C. albicans*, *C. tropicalis* with *C. zeylanoides* and these species are different from *C. krusei*, *C. brumpti*, *C. macedoniensis* and *C. pseudotropicalis*.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BIGUET (J.), HAVEZ (R.) et TRAN VAN KY. *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **249**, 895.
- [2] BIGUET (J.), HAVEZ (R.) et TRAN VAN KY. *Mykosen*, 1959, **2**, 115.
- [3] BISERTE (G.) et HAVEZ (R.). *Cancérol.*, 1955, **2**, 269.
- [4] FAHEY (J. L.), MC COY (P. F.) et GOULIAN (M.). *J. clin. Invest.*, 1958, **37**, 272.
- [5] FREUND (J.) et BONANTO (M. V.). *J. Immunol.*, 1944, **48**, 325.
- [6] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
- [7] JONES (C. P.) et MARTIN (D. S.). *Amer. J. Obst.*, 1938, **34**, 98.
- [8] JONSEN (J.). *Serological studies in the genus Candida*, Akademisk Trykningsentral, Blindern, Oslo, 1955.
- [9] LANGERON (M.) et GUERRA (P.). *Ann. Parasitol.*, 1938, **16**, 36.
- [10] LANGERON (M.) et GUERRA (P.). *Ann. Parasitol.*, 1939, **17**, 257.
- [11] PETERSON (E. A.) et SOBER (H. A.). *Amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 756.
- [12] PORTER (R. R.). *Biochem. J.*, 1955, **59**, 405.
- [13] POULIK (M. D.). *Nature*, 1957, **180**, 1477.
- [14] SMITHIES (O.). *Bioch. J.*, 1959, **75**, 585.
- [15] SWAHL (B.). *Scand. J. clin. lab. Invest.*, 1953, **5**, suppl. 9, 79.
- [16] TSUCHIYA (T.), FUKAZAWA (Y.) et KAWAKITA (S.). *Mycopath. Mycol. appl.*, 1959, **10**, 190.
- [17] WINTER (W. D.) et FOLEY (G. E.). *J. inf. Dis.*, 1955, **157**, 227.

# **EFFETS CYTOLOGIQUES DES ENZYMES PRODUITES AU COURS DE LA SPORULATION DES BACILLES AÉROBIES (\*)**

par J. TOMCSIK et M. BOUILLE (\*\*)

(*Institut d'Hygiène de l'Université de Bâle*)

Strange et Dark [4] ont isolé une enzyme *S* lysant la paroi cellulaire à partir des spores du genre *Bacillus*. Cette enzyme montre une activité optima à pH 8. Son activité est mise en évidence par une diminution de la densité optique des suspensions de parois cellulaires de *B. cereus* et la libération d'hexosamine.

Work [18] a isolé une enzyme semblable des spores d'un *Bacillus cereus*. Cette enzyme dissout quelques microorganismes Gram-négatifs qui ont subi un traitement préalable par le chloroforme ou l'acétone ; mais cette enzyme est inactive envers la plupart des microorganismes Gram-positifs étudiés. « L'enzyme des spores » (*S*) de Strange et Dark et celle de Work ont une activité optima au même pH. Toutefois, elles diffèrent par certaines de leur activités.

Strange et Dark [5], dans un travail plus récent, ont décrit une enzyme *V*, nettement différente de la précédente, dont l'activité optima est à pH 4,5. Cette enzyme a été isolée des sporanges de *Bacillus cereus*, et elle paraît être liée au phénomène de la sporulation. Cependant ses effets n'ont été étudiés par Strange et Dark qu'avec des méthodes optiques et chimiques. Il a paru important d'entreprendre une étude sur l'effet de cette enzyme sur la cytologie des bactéries sporulantes et en particulier leur effet sporangiolytique. Au cours de ce travail, il nous a paru assez rapidement que l'on pouvait distinguer des effets différents sur la paroi cellulaire et sur le cytoplasme, que nous avons dénommés « pariétolyse » et « cytoplasmolyse ». L'évolution de l'activité enzymatique au cours de la sporulation de microorganismes aérobies

(\*) Travail effectué avec l'aide du Bureau Fédéral du Travail (Berne).

(\*\*) Manuscrit reçu le 18 juillet 1960.

variés a été étudiée pendant et après leur culture sur milieu solide ou sur milieu liquide agité, à différents stades de la croissance et de la production de spores. Nous nous sommes d'autre part servis d'une méthode très simple, permettant une étude précise de la sporangiolysé à n'importe quel stade de la sporulation, ayant constaté que l'action sporangiolytique des germes sporulants est ralentie sans être arrêtée quand les préparations humides entre lame et lamelle sont conservées à la température du laboratoire. Différents stades de la parietolyse ont pu être ainsi observés au microscope à contraste de phase ; de plus l'action des différents anticorps dans leur interférence avec l'activité enzymatique a pu être étudiée.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

**MICROORGANISMES.** — Nous avons utilisé 33 souches de *B. cereus*, 1 de *B. thuringiensis* et 12 de *B. anthracis*, décrites par Tomcsik et Baumann-Grace [10].

**MILIEUX DE CULTURE.** — Les cultures ont été faites sur milieu solide ou en milieu liquide agité. Trois milieux différents ont été utilisés, gélosés ou non : le milieu Gladstone-Fildes (GF) [2], l'extrait de pomme de terre et le milieu de Grelet déficient en alanine [3].

**PRÉPARATION DE L'ENZYME V.** — Nous avons suivi exactement la technique de Strange et Dark [5].

**PRODUCTION DES ANTI-SÉRUMS.** — Les détails de la préparation des sérum anti-cellules végétatives de *B. cereus* et de *B. anthracis* (anti-polyosidique et anti-polypeptidique) ont été publiés [10, 17].

En ce qui concerne la préparation des sérum anti-spores de *B. cereus*, les spores obtenues sur extrait de pomme de terre ont d'abord été débarrassées des restes végétatifs selon une technique basée sur celle de Strange et Dark [16].

Les spores sont suspendues dans l'eau, le pH amené à 4,5 avec du HCl 0,1 N et la suspension de spores placée pendant quatre-vingt-dix minutes à la température de 48° C (à cette température, contrairement à celle recommandée par Strange et Dark, il n'y a pas de coagulation du cytoplasme). Les spores sont ensuite lavées deux fois à l'eau distillée et lyophilisées. Pour la préparation du sérum anti-spore, les spores lyophilisées sont mises en suspension dans une quantité de solution physiologique telle que la densité de la suspension soit un peu plus élevée que le tube n° 4 de l'échelle standard BaSO<sub>4</sub> de McFarland. Les injections ont été faites chez le lapin, dans la veine marginale de l'oreille. Les animaux ont reçu 6 à 8 injections de 2 ml à trois ou quatre jours d'intervalle. Sept à huit jours après la dernière injection, les lapins ont été saignés à la carotide. Les sérum anti-spores sont désignés selon les souches utilisées pour leur obtention.

*Réactions sérologiques microscopiques.* — Sur une lame porte-objet, on fait un mélange d'une goutte de suspension et d'une goutte d'antiserum. On recouvre d'une lamelle et on examine au microscope à contraste de phase, soit immédiatement, soit après un séjour plus ou moins prolongé en chambre humide.

## RÉSULTATS

### 1° Changements cytologiques survenant durant la sporulation et induits par les enzymes sporangiolytiques.

La plupart de nos souches de *B. cereus* et de *B. anthracis* sporulent lors de leur culture sur extrait de pomme de terre agité. Les spores apparaissent à 30°-37° C en treize à dix-sept heures [16]. Aucune spore n'est décelable jusqu'à dix-sept heures

TABLEAU I. — Relation entre la pariétolyse de *B. cereus*, souche 2, et la sporulation.

Milieu	Durée de la culture à 30° C	État de la sporulation pour 100 éléments dénombrés. a/b*	Effet sporangiolytique à 37° C	
			Pariétolyse	Cytoplasmolyse
Extrait de pomme de terre.	13 heures	0/15	50 mn. +	50 mn. —
	15 "	5/30	45 " ++	45 " —
	17 "	20/50	30 " +++	30 " +
G.F. agar	13 heures	0/0	135 mn. —	135 mn. —
	15 "	0/0	135 " —	135 " —
	17 "	0/0	135 " —	135 " —

\* a : spores libres ; b : spores dans les sporanges. Pariétolyse : +, uniquement des chaînes découpées contenant des spores ; ++, sporanges presque complètement dissous, cellules végétatives intactes ; +++, sporanges complètement dissous, cellules végétatives fortement dissoutes. Cytoplasmolyse : +, une partie des cellules végétatives à parois intactes sont vides.

quand la culture a eu lieu sur le milieu Gladstone-Fildes (GF) riche en acides aminés (Tomcsik et Baumann-Grace [9]).

La croissance sur les milieux extrait de pomme de terre et milieu de Grelet est très bonne. Les cultures de treize, quinze et dix-sept heures dans l'extrait de pomme de terre agité sont centrifugées et le culot est remis en suspension dans un petit volume de tampon de Mc Ilvaine pH 4,6 de telle manière que la densité de la suspension soit vingt-cinq fois plus élevée que celle de la culture originale. Des suspensions identiques sont faites à partir de cultures de treize, quinze et dix-sept heures en milieu GF. Les suspensions, additionnées d'une trace de toluène, sont placées au bain-marie à 37° C. Les résultats des examens au microscope à contraste de phase sont résumés dans le tableau I.

De ce tableau il ressort que les enzymes qui exercent une action lytique sur la paroi cellulaire sont produites parallèlement à la sporulation. En effectuant de semblables expériences, nous avons constaté que la température peut être élevée jusqu'à 48° C mais non pas au-delà, car une coagulation du cytoplasme rend alors difficile l'observation de l'effet pariétolytique.

Des expériences semblables réalisées avec de nombreuses souches de *B. cereus* et de *B. anthracis* montrent que le test cytologique le plus sensible de l'effet pariétolytique est le découpage des chaînes. Ce phénomène est particulièrement frappant quand les filaments longs sont transformés en chaînes courtes ou en formes monocellulaires. Ce phénomène est probablement dû à la séparation des parois transversales (intercellulaires) incomplètement divisées. Un effet semblable de découpage des chaînes est observé en quelques secondes par un traitement de la suspension bactérienne avec des ultrasons [15]. L'enzyme pariétolytique attaque probablement d'abord les liaisons intercellulaires microscopiquement inapparentes qui fixent entre elles les parois transversales incomplètement divisées. A ce moment les parois qui, auparavant, se trouvaient entre deux cellules ne sont pas encore modifiées. Quelquefois les parois transversales sont cependant touchées et des formes ovoïdes apparaissent (pl. I, fig. 1); celles-ci rappellent les formations observées au cours des premiers stades de l'action du lysozyme sur *B. megaterium* (Tomcsik et Guex-Holzer [12]).

Les parois des sporanges sont dissoutes habituellement par des enzymes produites à l'intérieur du sporange. Quand l'action des enzymes est rapide et quand elle a lieu en présence d'anticorps anti-paroi cellulaire ajoutés à la préparation, ceux-ci précipitent la matière de la paroi cellulaire, qui vient d'être dissoute par l'enzyme. Un « gonflement » apparent du sporangium peut être observé (Tomcsik et Baumann-Grace [9]). En absence des anticorps anti-paroi cellulaire, les parois des sporanges montrent une désintégration en granules à peine visibles, au moment de la libération des spores (pl. I, fig. 2). Parallèlement à la désintégration des sporanges, les enzymes sont libérées; cependant leur concentration n'est pas suffisante dans la plupart des cas pour dissoudre les parois des cellules végétatives présentes. Suivant la méthode de Strange et Dark [5] déjà citée, la concentration des enzymes libérées peut être augmentée et les cellules végétatives sont alors dissoutes (pl. I, fig. 3). Le tableau I montre que ce stade n'est atteint rapidement que dans le cas où la sporulation intracellulaire de la culture initiale est suffisamment élevée.

Les observations cytologiques que nous décrivons suggèrent un effet éminemment pariétolytique des enzymes de la sporula-

tion. L'effet des enzymes autolytiques est beaucoup moins prononcé. Il est indépendant de la sporulation et se manifeste surtout par une modification de l'aspect du cytoplasme. Dans l'étude des enzymes de la sporulation, nous n'avons observé que rarement un effet cytoplasmolytique quelque peu prononcé. Habituellement, le cytoplasme n'est affecté que consécutivement à la désintégration de la paroi cellulaire. Il entre en solution directement ou après avoir pris une forme sphérique. Ces formes sphériques ne peuvent être cependant stabilisées avec une solution isotonique de saccharose, comme c'est le cas avec les protoplastes de *B. megaterium* obtenus par l'action du lysozyme, mais ils prennent, comme il sera montré plus tard, en présence de certains sérums, des tailles étonnamment grandes.

## 2<sup>e</sup> Inhibition de la pariétolyse enzymatique par les anticorps.

Tomcsik et Baumann-Grace [9] ont montré avec une culture de *B. cereus* souche 2, richement sporulée, que l'addition de l'immunsérum homologue provoque un gonflement du sporange. Cette réaction est une variété de la « réaction spécifique de la paroi » décrite par Tomcsik et Guex-Holzer [12, 13]. Pour rendre cette réaction visible en contraste de phase avec *B. megaterium*, il faut que le cytoplasme soit préalablement détruit, soit par action d'enzymes protéolytiques [8], soit par un traitement mécanique, soit par la séparation de la paroi cellulaire par l'action du lysozyme [11, 13]. La réaction de gonflement du sporange provient vraisemblablement d'une réaction qui ressemble à celle du lysozyme. Les enzymes formées au cours de la sporulation dépolymérisent et dissolvent partiellement les parois des sporanges. Les substances dissoutes sont cependant précipitées par l'anticorps spécifique sur la surface du sporange et conduisent ainsi à une image de gonflement apparent. Au cours de ce travail, plusieurs variétés morphologiques de cette réaction ont été observées sur un nombre important de souches de *B. cereus* et de *B. anthracis* non capsulé.

La fig. 4, pl. I, montre une variété très particulière de cette réaction. Elle est obtenue régulièrement quand un anticorps anti-polyosidique spécifique est ajouté à une culture de *B. cereus* bien sporulée (souche 21), et quand cette préparation est incubée pendant plusieurs heures ou pendant un ou deux jours en chambre humide. La chaîne n'est pas désarticulée, les spores ne sont pas libérées, elles restent incluses, entourées d'un halo, dans une masse protoplasmique énormément gonflée. Nous ne savons pas si le halo correspond à l'exosporium. D'autre part il est à noter que l'anticorps polyosidique inhibe jusqu'à un certain point la pariétolyse enzymatique.

Nous avons effectué un examen systématique de 10 souches de *B. anthracis*, les unes asporogènes, les autres modérément ou fortement sporulantes. Le sérum anti-polyosidique de *B. anthracis*, souche 18, ne contient pas d'anticorps antipolypeptique et le

TABLEAU II — Sporulation de 10 souches de *B. anthracis*, cultivées vingt-quatre heures à 37° C sur l'extrait de pomme de terre gélosé et inhibition de la pariétolyse enzymatique par les anticorps.

N°	N° de la souche	État de la sporulation pour 100 éléments dénombrés. a/b	Contrôle ou anti-sérum en chambre humide.	17 heures en chambre humide	
				Gonflement du sporange.	Pariétolyse
1	11	0/0	C	—	—
			Po	—	—
			Pp	—	—
2	12	0/0,5	C	—	—
			Po	—	—
			Pp	—	—
3	4	0,5/0,1	C	—	—
			Po	—	—
			Pp	—	—
4	8	2/0	C	—	—
			Po	+	—
			Pp	—	—
5	6	0,1/5	C	—	—
			Po	—	—
			Pp	—	—
6	7	10/0,1	C	—	++
			Po	+++	—
			Pp	—	—
7	1	1/50	C	—	+++
			Po	+	—
			Pp	—	++
8	9	60/0,5	C	—	+++
			Po	+++	—
			Pp	—	+
9	3	70/0,5	C	—	+++
			Po	++	—
			Pp	—	++
10	10	70/0,5	C	—	+++
			Po	+++	±
			Pp	—	++

C : contrôle. Po : sérum anti-polyosidique. Pp : sérum anti-polypeptidique. a : spores libres. b : spores dans les sporanges.

sérum anti-polypeptidique ne contient pas d'anticorps antipolyosidique (tableau II).

Aucune pariétolyse ne s'observe avec les souches 1-5 qui sont asporogènes ou très faiblement sporulantes. La pariétolyse est cependant considérable, s'étendant aussi aux formes végétatives, malgré l'absence d'une concentration préalable de la culture avec les souches bien sporulantes. La pariétolyse n'est inhibée d'une manière marquée que dans le cas où l'on a ajouté aux préparations le sérum antipolyosidique. La réaction de gonflement du sporange

peut s'observer à divers degrés, même après dix-sept heures d'incubation en chambre humide. Fait plus frappant : après ce temps d'observation, les chaînes ne sont pas désarticulées et les spores ne sont pas libérées. Une seule explication nous paraît possible : la précipitation de substances provenant de la paroi cellulaire, enzymatiquement dissoutes, à la surface des cellules incomplètement lysées par les enzymes, conserve aux chaînes leur forme originale et empêche la libération des spores. Dans les suspensions qui ont été concentrées, renfermant une forte proportion de spores intracellulaires, la pariétolyse enzymatique est plus rapide et l'effet d'inhibition par le sérum anti-polyosidique est d'une durée plus courte. A l'exception d'une légère inhibition occasionnellement observée, aucun effet n'est exercé par le sérum anti-polypeptidique. Etant donné que 4 sérums anti-polyosidiques différents de *B. anthracis* exercent une inhibition considérable de la pariétolyse enzymatique et qu'aucun effet semblable ne peut être observé avec 4 sérums antipolypeptidiques différents de *B. anthracis* ainsi qu'avec 4 sérums spécifiques différents de *B. cereus*, il est permis de conclure que l'effet inhibiteur est spécifique et ne se manifeste qu'avec l'anticorps anti-polyosidique de *B. anthracis*. Cette observation confirme d'autre part les observations antérieures de Tomcsik [7] selon lesquelles le polypeptide glutamique ne participe pas à l'édification de la paroi cellulaire de *B. anthracis*. Les propriétés physiques de cette paroi cellulaire sont déterminées par le polyoside spécifique du bacille du charbon, la seule substance spécifique qui peut être isolée quand la paroi cellulaire purifiée de ce bacille est dissoute dans l'antiformine [1].

En réalisant ces expériences, deux autres observations ont été faites. L'une concerne la germination des spores libérées en présence de certains antisérum. Les deux antisérum qui favorisent remarquablement la germination contiennent les anticorps anti-polyosidiques.

Etant donné que deux autres sérums renfermant des anticorps antipolyosidiques et quatre autres sérums contenant les anticorps anti-polypeptidiques ne favorisent pas la germination, aucune corrélation ne peut être établie entre leur présence et la germination. L'autre observation concerne l'effet conservateur que possèdent certains antisérum vis-à-vis du cytoplasme et qui sera décrit dans le chapitre suivant.

3° *Production de masses sphériques de cytoplasme en présence de certains sérums.*

Dans des préparations de certaines souches de *B. cereus* ou *B. anthracis* en voie de sporulation, conservées à la température du laboratoire en chambre humide, des masses cytoplasmiques

sphériques, semblables à des protoplastes apparaissent (pl. II, fig. 5). Une observation suivie au microscope en contraste de phase permet de suivre leur formation. L'extrusion de masses protoplasmiques sphériques s'observe le plus clairement aux pôles des bacilles et des chaînes (pl. II, fig. 6 et 8), mais parfois on peut voir des masses cytoplasmiques demi-sphériques apparaître à la surface latérale de la paroi cellulaire (pl. II, fig. 6). Elles adhèrent à celle-ci et montrent une légère tendance à la dissolution. Le diamètre des éléments sphériques varie habituellement de 1 à 5  $\mu$  quand le temps de l'incubation des préparations humides est court. Après une incubation plus longue, leur diamètre varie de 5 à 20  $\mu$  (pl. II, fig. 7 et 8). On peut donc supposer que plusieurs de ces masses cytoplasmiques peuvent fusionner entre elles en prenant de nouveau une forme sphérique régulière. La production de ces éléments varie avec la souche, l'état de sporulation, l'addition de sérum et le temps d'incubation en chambre humide. Avec le *B. cereus* souche 1, un grand nombre de corps sphériques apparaissent une heure après l'addition du sérum anti-*B. cereus* forme végétative souche C<sub>2</sub>. Cependant l'addition de cet antisérum n'est pas suivie de l'apparition de tels éléments quand il est ajouté à la souche homologue *B. cereus* C<sub>2</sub>, même après une incubation prolongée.

#### LÉGENDE DES PLANCHES

Microscope à contraste de phase. Gr.  $\times 2200$ . Préparation humide entre lame et lamelle conservée à la température du laboratoire dans des chambres humides.

#### PLANCHE I

FIG. 1. — *B. anthracis*, souche 4. Culture sur extrait de pomme de terre gélosé, vingt-quatre heures à 37° C. Filaments longs avec 1 p. 100 de spores. Suspension des bactéries dans une solution isotonique de saccharose. Premier signe de l'activité de l'enzyme : découpage des chaînes après dix-sept heures en chambre humide.

FIG. 2. — *B. cereus*, souche 28. Culture sur extrait de pomme de terre agité, quatorze heures à 30° C. 85 p. 100 de spores dans les sporanges. La majorité des chaînes sont agglomérées. Suspension dans l'eau physiologique. Sporangiolyse très avancée après vingt-quatre heures en chambre humide.

FIG. 3. — *B. cereus*, souche 22. Culture sur milieu de Grelet sans alanine, agitée trente-sept heures à 30° C. 30 p. 100 de spores libres. Suspension dans l'eau physiologique. Pariétolyse très avancée et plasmolyse intéressant les formes végétatives après neuf heures en chambre humide.

FIG. 4. — *B. cereus*, souche 21. Culture sur milieu de Grelet sans alanine, agitée vingt-deux heures à 30° C, puis centrifugée et remise en suspension dans l'eau distillée, et agitée pendant dix-huit heures à 30° C. 20 p. 100 de spores dans les sporanges. Suspension en eau physiologique additionnée d'un sérum anti-polyosidique, forme particulière de gonflement qui empêche la dissolution des chaînes, après vingt-quatre heures en chambre humide.



FIG. 1.



FIG. 2.



FIG. 3.



FIG. 4.

## PLANCHE II

*B. cereus*, souche 33. Culture sur extrait de pomme de terre ou sur milieu de Grelet sans alanine, agité vingt-heures à 30° C. Nombreuses spores intracellulaires. Les cultures sont centrifugées et remises en suspension dans l'eau physiologique. Les préparations humides sont faites en utilisant le sérum anti-*B. cereus* forme végétative souche 2. Les examens sont faits après conservation des préparations humides durant des temps variables dans la chambre humide. Des éléments cytoplasmiques sphériques apparemment intacts sont observés après un séjour de cinq à vingt-cinq heures.

FIG. 5. — Huit heures en chambre humide. Éléments sphériques de taille variée. Après une incubation plus longue, la taille des éléments sphériques devient nettement plus grande.

FIG. 6. — Éléments sphériques dans la région polaire des bacilles ou des filaments (cas le plus fréquent) ; petites masses, en forme de segments de sphère, le long de la paroi cellulaire latérale.

FIG. 7. — Vingt-cinq heures, dans la chambre humide. Spores incomplètement libérées. Très grands éléments sphériques ; nouveaux éléments sphériques rares.

FIG. 8. — Même légende que figure 7. Très grands éléments sphériques.



FIG. 5.



FIG. 6.

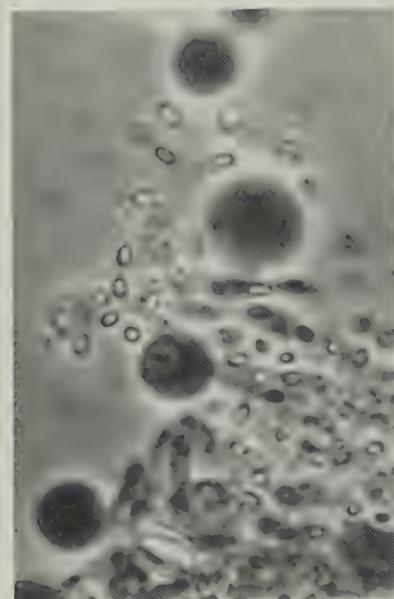


FIG. 7.



FIG. 8.



Dans certaines préparations les grandes masses protoplasmiques globoïdes persistent pendant quarante-huit heures, sans montrer aucune tendance à la dissolution. Dans d'autres, elles deviennent pâles ou vides et une couche superficielle plus dense, pareille à une membrane cytoplasmique, peut être observée à leur périphérie. En ce qui concerne la production et la survie de ces éléments l'action favorable des antisérum appropriés ne peut pas être remplacée par une solution isotonique de saccharose. 10 à 20 p. 100 des souches sporulantes de *B. cereus* et *B. anthracis* montrent ce phénomène après addition des antisérum appropriés. Cependant l'antisérum donnant un effet optimum avec une souche n'a pas la même efficacité avec les autres souches.

Nous ne pensons pas que les masses protoplasmiques sphériques soient de la même nature que les protoplastes produits par le lysozyme. Ces derniers sont uniformes en taille ; ils dérivent invariablement de cellules séparées ; ils sont stabilisés par une solution isotonique de saccharose (Weibull [19]) ou par une solution de Ringer (Tomesik [6]) et sont instables dans le sérum (Tomesik et Guex-Holzer [42]). Ils n'ont aucune tendance à fusionner entre eux et sont libérés après la dissolution enzymatique totale de la paroi cellulaire. Les éléments cytoplasmiques sphériques observés au cours de ce travail sont au contraire libérés avant la dissolution enzymatique complète de la paroi. Ils peuvent se former d'une partie du cytoplasme d'une seule cellule ou résulter de la coalescence du cytoplasme de plusieurs cellules. De ce fait leurs dimensions sont très variables. De plus, ils sont produits et stabilisés en présence de certains sérum à la dilution de 1/2, qui détruit les protoplastes produits par le lysozyme. Par contre, ils n'apparaissent pas et ils ne sont pas stabilisés dans les solutions isotoniques de saccharose et de Ringer. Si nous considérons leur genèse, il faut admettre :

- a) Une lésion enzymatique de la paroi cellulaire.
- b) Un effet de certains sérum qui protègent les masses cytoplasmiques libérées de la dissolution totale.

Les observations décrites dans ce chapitre suggèrent que les enzymes produites durant la sporulation n'agissent pas de façon appréciable sur le cytoplasme. Leur effet principal est la pariétolyse.

#### 4<sup>e</sup> Effet cytologique de l'addition de l'enzyme V sur des cellules végétatives.

Les enzymes V sont préparées selon le procédé de Strange et Dark [5] à partir de cultures bien sporulées de *B. cereus* et *B. anthracis* dans l'extrait de pomme de terre agité, à la seule

différence près que nous n'avons pas ajouté à ces cultures de milieu Gladstone-Fildes. Dans les expériences préliminaires, nous avons déterminé combien de temps la culture doit être incubée pour qu'elle contienne le plus grand nombre de spores non libérées. Avec notre technique, ce stade survient pour *B. cereus* souche 2 en seize à dix-sept heures. La culture est alors centrifugée, lavée deux fois avec une solution d'eau physiologique, une fois avec de l'eau distillée et remise en suspension dans un volume de tampon Mc Ilvaine, pH 4,6, correspondant à 4 p. 100 du volume original. Dans la suspension conservée pendant une nuit à 0° C, la sporangiolysé est complète et les cellules végétatives encore présentes se trouvent être dissoutes en dix minutes à 37° C. Une telle solution de l'enzyme V brute est nettement active à la dilution 1/10 quand elle est mise au contact de cellules végétatives faiblement sporulées.

L'activité d'une enzyme V exogène a été étudiée dans des conditions rigoureuses, en prenant comme substrat des *B. cereus* cultivés sur agar GF pendant quatorze heures et ne présentant aucun signe de sporulation. L'enzyme V *cereus* souche 2 à 48° C et jusqu'à la dilution finale 1/5 découpe complètement et rapidement les chaînes en éléments monocellulaires. Les résidus granulés de ces cellules ne sont pas complètement disparus pendant quelques heures. L'enzyme V de souche C<sub>2</sub> présente le même degré d'activité vis-à-vis des souches 2, 7, 14 et 21 de *B. cereus*; elle est également active, mais à un degré moindre vis-à-vis des souches de *B. anthracis*. Elle semble inactive envers les formes végétatives jeunes récemment germées. Ce fait indique une différence importante dans la structure de la paroi cellulaire des cellules jeunes et âgées.

Ces observations ont été faites en utilisant des solutions tampons aux pH 4,6, 5,4, 6,8. Conformément aux observations de Strange et Dark [5] l'effet pariétolytique est optimum à pH 4,6. En comparant l'effet des températures 37°, 48° ou 56° C, nous avons observé que cette dernière induit le plus rapidement le démembrement des chaînes. Cependant nous avons préféré pour la plupart de nos études la température de 48° C, le cytoplasme n'étant pas coagulé à cette température comme à 56° C.

##### 5° Absence de parallélisme entre la production d'enzyme et la sporulation.

Dans la majorité de nos observations, le parallélisme entre l'intensité de la sporulation et la production de l'enzyme est très étroit. Il existe toutefois des exceptions.

Tomcsik et Baumann-Grace [9] ont observé dans les cultures en extrait de pomme de terre gélosé de *Bacillus M* (variété de *B. megaterium*) 90 p. 100 de formes sporulées en quarante-huit

heures. Aucune spore, cependant, n'était libérée dans les cultures, même après dix jours. Les parois cellulaires des longues chaînes restaient intactes et la capsule complexe de structures polyosidiques et en même temps polypeptidiques n'était pas affectée enzymatiquement. Dans ce cas, l'enzyme *V* n'était évidemment pas produite parallèlement à une sporulation qui était excellente.

Des enzymes de nature différente peuvent être produites, dans certaines conditions de culture en l'absence de sporulation. Nous avons observé, au cours de ce travail, que *B. anthracis* souche 9, cultivé pendant vingt et une heures en milieu GF liquide, puis transféré dans l'eau distillée et agité, ne produit aucune spore, mais que le cytoplasme des longues chaînes devient transparent de façon homogène, ce qui rend bien visible la paroi cellulaire et transversale. Il y a eu ici sans doute une action cytoplasmolytique quelque peu semblable à une autolyse, mais qui apparaît plus rapidement et qui est beaucoup plus uniforme que les changements autolytiques habituels des bactéries.

#### RÉSUMÉ.

La production des enzymes *V*, isolées d'abord par Strange et Dark, est, sauf quelques exceptions, strictement parallèle à la sporulation de *B. cereus* et *B. anthracis*. Leur effet cytologique, à pH 4,6 est avant tout une pariétolyse. Il se traduit par un découpage des chaînes, par la séparation des parois transversales, une désintégration granulaire suivie de la dissolution des parois cellulaires latérales. L'effet de ces enzymes est retardé ou inhibé par les anticorps anti-polyosidiques homologues de la paroi, mais il est à peine influencé par l'anticorps anti-polypeptidique. L'effet cytoplasmolytique des enzymes *V* est négligeable. Le cytoplasme rendu libre par la désintégration de la paroi cellulaire est dissous dans les solutions isotoniques de saccharose, de Ringer et eau physiologique. Certains sérums exercent une action protectrice sur des éléments du cytoplasme qui prennent alors une forme sphérique régulière et qui sont différents des protoplastes de *B. megaterium* formés par l'action du lysozyme.

#### SUMMARY

##### CYTOTOLOGICAL EFFECTS OF ENZYMES ELABORATED IN THE COURSE OF SPORULATION OF AEROBIC BACILLI.

The elaboration of *V*-enzymes, isolated for the first time by Strange and Dark, is with very few exceptions strictly parallel to the sporulation of *B. cereus* and *B. anthracis*. Their cytological effect at pH 4,6 is before all a cell-wall lysis : bacterial

chains are sectioned by lysis of transversal cell-walls, then granular disintegration followed by dissolution of lateral cell-walls takes place. The effect of these enzymes is delayed or inhibited by cell-wall anti-polysaccharide antibodies, whereas anti-polypeptide antibodies have almost no influence.

The cytoplasmolytic effect of V-enzymes is negligible. The cytoplasm released by disintegration of the cell-walls is dissolved in isotonic sucrose solution, Ringer or saline solutions.

Certain sera protect the cytoplasmic elements, which then take a spherical form and differ from *B. megaterium* protoplasts induced by lysozyme.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAUMANN-GRACE (J. B.), KOVACS (H.) et TOMCSIK (J.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1959, **22**, 158.
- [2] GLADSTONE (G. P.) et FILDES (P.). *Brit. J. exp. Path.*, 1940, **21**, 161.
- [3] GRELET (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 60.
- [4] STRANGE (R. E.) et DARK (F. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **16**, 236.
- [5] STRANGE (R. E.) et DARK (F. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **17**, 525.
- [6] TOMCSIK (J.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **89**, 459.
- [7] TOMCSIK (J.) in *Bacterial anatomy*, 1956, p. 41. Cambridge University Press.
- [8] TOMCSIK (J.) et BAUMANN-GRACE (J. B.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1957, **20**, 129.
- [9] TOMCSIK (J.) et BAUMANN-GRACE (J. B.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1958, **21**, 914.
- [10] TOMCSIK (J.) et BAUMANN-GRACE (J. B.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1959, **22**, 144.
- [11] TOMCSIK (J.) et BAUMANN-GRACE (J. B.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **13**, 105.
- [12] TOMCSIK (J.) et GUEX-HOLZER (S.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1952, **15**, 517.
- [13] TOMCSIK (J.) et GUEX-HOLZER (S.). *J. gen. Microbiol.*, 1954, **10**, 317.
- [14] TOMCSIK (J.) et BAUMANN-GRACE (J. B.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1960, **23**, 172.
- [15] TOMCSIK (J.) et BOUILLE (M.). *Experientia*, 1959, **15**, 375.
- [16] TOMCSIK (J.), BOUILLE (M.) et BAUMANN-GRACE, (J. B.). *Schweiz. Z. Path. Bakt.*, 1959, **22**, 630.
- [17] TOMCSIK (J.) et SZONGOTT (H.). *Z. Immun. Forsch.*, 1933, **77**, 86.
- [18] WORK (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 468.
- [19] WEIBULL (C.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 688.

# **DE LA NATURE DE LA MEMBRANE LIMITANT LES PROTOPLASTES OBTENUS PAR L'ACTION DU LYSOZYME SUR *BACILLUS MEGATERIUM***

par L. COLOBERT (\*).

(*Laboratoire de Bactériologie de la Section technique  
de Recherches et d'Etudes des Services de Santé des Armées,  
108, bd Pinel, Lyon*)

On sait que la lyse de *Bacillus megaterium*, par le lysozyme, peut s'accompagner dans certaines conditions de la formation de protoplastes [24, 26]. Afin de ne pas présumer de la nature de ces éléments, nous préférions les désigner dans ce mémoire sous le nom de sphéroplastes [19]. Lorsque la pression osmotique du milieu n'est pas convenablement ajustée par dissolution d'un non-électrolyte, l'exosmose du protoplasme, à travers la mince membrane limitant extérieurement le sphéroplaste, se produit ; celui-ci se vide de son contenu et, la membrane persistant, il se réduit à une vésicule creuse. On admet habituellement que la membrane constituant cette vésicule n'est pas autre chose que la membrane cytoplasmique de la bactérie [27, 28]. Nous exposons dans ce mémoire des observations qui nous ont amené à penser qu'en réalité il s'agit non pas de la membrane cytoplasmique dans son état naturel, mais d'une formation artificielle due à l'insolubilisation superficielle du protoplasme par fixation d'une protéine de charge électrique opposée, en l'espèce le lysozyme lui-même. Dans le texte, nous désignerons les vésicules creuses résiduelles comme le fait Weibull [26, 27, 28], sous le nom de *fantômes* de sphéroplastes.

## **TECHNIQUES.**

Le lysozyme est du lysozyme d'œuf cristallisé fourni par la firme Armour (1).

La souche de *Bacillus megaterium* utilisée est la souche KM que

(\*) Manuscrit reçu le 28 juillet 1960. Il a été présenté oralement au VII<sup>e</sup> Congrès International de Microbiologie (Stockholm, 1958 [7]).

(1) Armour Lab., Fob Kankakee, Illinois, U. S. A.

Weibull nous a procurée. Les bactéries sont récoltées après un développement de vingt-quatre heures à 26° sur gélose nutritive ordinaire. Elles sont mises en suspension dans du tampon phosphate monosodique dipotassique 0,033 M de pH 7,2. Toutes les expériences ont été réalisées avec une concentration de bactéries égale à 2 mg en poids sec par centimètre cube. Diluée au 1/10 une telle suspension a une densité optique de 0,190 dans la longueur d'onde de 760 m $\mu$ . Le mode opératoire est le suivant :

On réalise une suspension de bactéries dans la solution-tampon dont la densité optique est ajustée de telle manière que diluée au 1/10 elle soit égale à 0,190. Dans une cuve du photomètre, on ajoute à 0,3 cm<sup>3</sup> d'une solution dans le même tampon des réactifs à l'étude (saccharose, protamine, etc.), ou encore 0,3 cm<sup>3</sup> de la solution-tampon elle-même. La solution de lysozyme dans le tampon, titrée par simple pesée de l'enzyme cristallisée commerciale est ajoutée au dernier moment. Le volume final est donc de 3 cm<sup>3</sup>; la densité optique mesurée sur une dilution au 1/10 est alors de 0,170. Dans le texte, les concentrations des réactifs sont également les concentrations finales. Toutes les expériences ont été conduites en chambré thermostatisée à la température uniforme de 26°.

La méthode de dosage d'activité du lysozyme a déjà été décrite [5].

Le microscope électronique est de marque Philips et les préparations obtenues par simple séchage à l'air sans fixation préalable. Ombrage au palladium.

#### RÉSULTATS.

**INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN LYSOZYME SUR LA LYSE.** — Lorsqu'on suit au photomètre l'effet du lysozyme sur une suspension de *Bacillus megaterium* dans les conditions qui ont été préconisées, on constate que les phénomènes diffèrent tout à fait suivant que la concentration en lysozyme utilisée est supérieure ou inférieure à environ 250  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . La figure 1 montre quelle est la variation de la densité optique des suspensions pour des concentrations de lysozyme inférieures à 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . En attendant suffisamment longtemps, on arrive toujours à obtenir une clarification pratiquement totale et, en première approximation au moins, la vitesse de celle-ci est proportionnelle à la concentration en enzyme. On voit sur la figure 2 qu'il n'en est pas du tout de même pour des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . La clarification de la suspension n'est plus que partielle ou se trouve même totalement inhibée ; ainsi, pour une concentration de 600  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , la densité optique de la suspension demeure invariable et pour des concentrations encore plus élevées, on observe même une augmentation considérable de l'opacité de la suspension bactérienne.

**ETUDE MORPHOLOGIQUE.** — Nous avons vérifié que, comme Weibull l'a établi [26], on ralentit ou inhibe la lyse quand on ajoute au milieu suffisamment de saccharose (0,18 M) pour assurer une

pression osmotique capable d'équilibrer celle qui règne à l'intérieur des bactéries. Dans ces conditions, alors que le saccharose ne modifie nullement l'activité du lysozyme et la dissolution consécutive des parois bactériennes, il ralentit en revanche considérablement la dispersion du protoplasme des bactéries dépouillées de

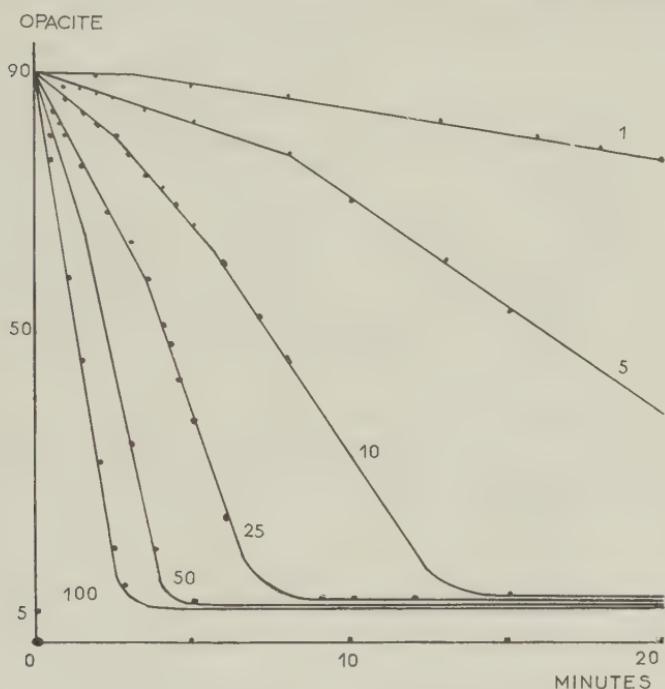


FIG. 1. — Variation de la densité optique d'une suspension de *B. megaterium* sous l'influence de concentrations de lysozyme variant entre 1 et 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

leur paroi. Il devient alors facile de suivre les modifications morphologiques provoquées par le lysozyme.

Le microscope électronique montre que les bactéries normales se présentent comme des corps bacillaires, opaques, de section presque circulaire, à surface finement chagrinée. Lorsque dans les conditions de nos expériences, la concentration en lysozyme est inférieure à environ 200  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , les bactéries conservent leur forme de bacille, mais leur aspect est très modifié : elles paraissent constituées de granules accolés, d'environ 100  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cet aspect très caractéristique rappelle de façon frappante celui que nous avons décrit sous le nom de *gymnoplaste* lors de la lyse des

sarcines [4] par le lysozyme et que nous savons représenter le corps bactérien entièrement dépourvu de la paroi, la masse protoplasmique nue. On notera cependant ici que le gymnopaste ne se présente pas sous la forme ronde de sphéroplaste, mais conserve une forme générale allongée en bâtonnet. Il faut noter encore que ces gymnopastes sont fragiles et se lysent peu à peu, même dans les conditions optima de concentration en saccharose.

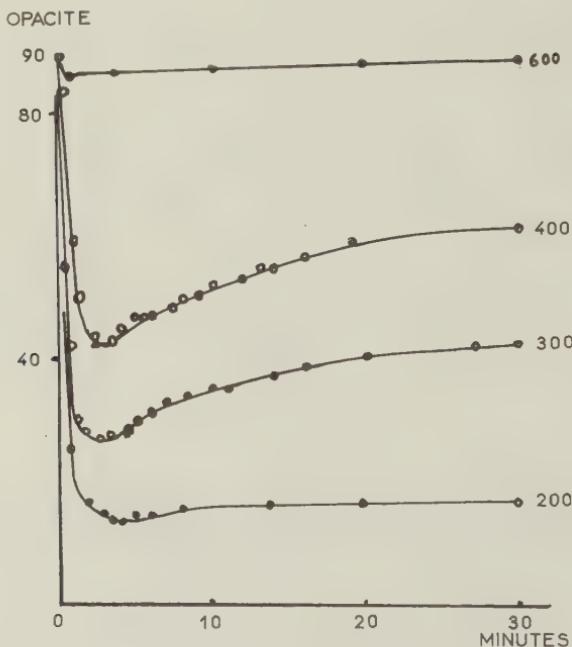


FIG. 2. — Variation de la densité optique d'une suspension de *B. megaterium*, sous l'influence de concentrations de lysozyme variant entre 200 et 600  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

Quand la concentration en lysozyme est supérieure à 250  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , on observe que le nombre des gymnopastes qui se forment est d'autant plus faible que la concentration en enzyme est plus élevée, quoique la lyse photométrique ne se produise pas. C'est que le plus grand nombre de bactéries tout en conservant la forme bacillaire se présente dans un état nouveau très différent à la fois de celui des gymnopastes et des bactéries normales. Le contour devient flou, difficile à définir, la surface s'altère d'une manière irrégulière, donnant l'impression de se corroder comme fait le fer rongé par la rouille. Manifestement la paroi est profondément

modifiée mais non éliminée. Cet état est l'homologue de celui que nous avons décrit sous le nom d'*angioplaste* dans la lyse des sarcines par le lysozyme [4, 6].

Lorsque les examens morphologiques sont réalisés en l'absence de saccharose, on retrouve les deux formes caractéristiques : *gymnoplasme* et *angioplaste*, mais l'apparition des *gymnoplastes* est très transitoire et difficile à saisir ; ils se dissocient rapidement en granules et la lyse s'achève. Tout au contraire, les *angioplastes* persistent indéfiniment dans le milieu quoique l'exosmose du protoplasme se produise. Comme la clarification de la suspension se trouve très ralentie ou même totalement inhibée, on retrouve le phénomène de l'inhibition paradoxale de la lyse par excès d'enzyme que nous avons précédemment étudié dans le cas des sarcines [4]. Au terme ultime de ce processus, les bactéries ne sont plus représentées que par des éléments aplatis, mais qui conservent cependant la forme générale du bacille. On a l'impression qu'il s'agit de la paroi ectoplasmique modifiée, mais non intégralement dissoute, retenant des fragments de protoplasme insolubilisé.

**LES ANGIOPLASTES CONTIENNENT DU LYSOZYME.** — Comme nous savons que l'enveloppe des *angioplastes* obtenus avec les sarcines contient du lysozyme qui paraît en faire partie intégrante [4], nous avons recherché le même caractère sur les *angioplastes* de *B. megaterium*. Tout d'abord on a vérifié que l'addition de chlorure de

TABLEAU I.

CONCENTRA-TION INITIALE EN LYSOZYME ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )	CONCENTRATION DU LYSOZYME DANS LE SURNAGEANT, EN UNITÉS CONVENTIONNELLES D'ACTIVITÉ PAR $\text{cm}^3$	CONCENTRATION DU LYSOZYME DANS LE SURNAGEANT APRÈS LE PREMIER LAVAGE DU CULOT	CONCENTRATION DU LYSOZYME DANS LE SURNAGEANT APRÈS TRAITEMENT DU CULOT PAR LE CHLORURE DE SODIUM
1 000	238	1,2	151
500	27	4	166
400	12	4	145

sodium en concentration convenable détruit les *angioplastes*, comme le montre l'expérience suivante. Si dans les conditions normalisées, en l'absence de saccharose, on ajoute du lysozyme pour obtenir une concentration finale de  $1\,000\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , la densité optique de la suspension s'élève à 1,900 et demeure stabilisée à cette valeur. Au bout de la cinquième heure, on ajoute à  $4\ \text{cm}^3$  de cette suspen-

sion  $0,4 \text{ cm}^3$  d'une solution de chlorure de sodium 2 M, ce qui réalise la concentration finale 0,18 M en chlorure de sodium ; la densité optique tombe brusquement (30 secondes) à 0,017.

On a utilisé cette propriété pour mettre en évidence la fixation du lysozyme sur les angioplastes. Les résultats sont résumés dans le tableau I, pour des concentrations finales en lysozyme de 1 000, 500 et 400 µg/cm<sup>3</sup>. Après huit heures à 26°, on dose le lysozyme dans le surnageant de centrifugation. Le culot d'angioplastes est alors repris dans de l'eau distillée et ramené ainsi au volume primitif. On dose de nouveau le lysozyme dans le surnageant de centrifugation. Le culot est repris par une solution de chlorure de sodium 0,18 M et ramené au volume primitif. On titre de nouveau le lysozyme dans le surnageant. Il est remarquable que la quantité de lysozyme fixée sur les bactéries soit du même ordre de grandeur pour des concentrations initiales en lysozyme variant entre 1 000 et 400 µg.

**FORMATION DES SPHÉROPLASTES.** — Il est tout à fait remarquable que les corps sphériques décrits par Weibull sous le nom de protoplastes n'apparaissent que lorsque la concentration enzymatique (pour une concentration en bactéries donnée) prend une valeur étroitement déterminée, juste située à la limite inférieure

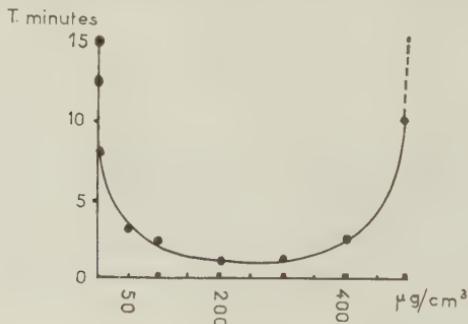


FIG. 3. — Variation du temps nécessaire pour qu'apparaissent les sphéroplastes, en fonction de concentrations variables de lysozyme.

des concentrations en lysozyme pour lesquelles l'inhibition paradoxale commence à se manifester. Plus on s'éloigne de cette valeur optimale, plus se prolonge le temps nécessaire pour qu'apparaissent les premiers sphéroplastes et plus s'abaisse le pourcentage de bactéries se transformant en sphéroplastes. La figure 3 objective

ces données : elle représente la variation du temps nécessaire pour qu'apparaissent les premiers corps sphériques. Ce temps est en effet une grandeur mesurable avec précision, alors que la détermination du nombre des sphéroplastes est difficile ; mais ces deux grandeurs sont manifestement en étroite corrélation. La courbe est symétrique, la concentration optima pour l'apparition des corps sphériques est comprise entre 150 et 300 microgrammes par centimètre cube. A cette concentration, la totalité des bactéries se transforme en sphéroplastes en 60 secondes, alors que pour des concentrations de 10 ou de 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , par exemple, il faut attendre 3 600 secondes pour voir apparaître les premiers corps sphériques, et encore seulement 1 p. 100 des bactéries se révèle capable de subir cette transformation. La symétrie de la courbe ne doit pas faire oublier la différence fondamentale qui existe de part et d'autre de l'axe de symétrie : la branche de gauche correspond en effet aux concentrations en enzyme pour lesquelles la lyse totale peut être atteinte, tandis que dans la branche de droite on se trouve dans les conditions de l'inhibition paradoxale, si bien que la transformation en sphéroplastes n'étant plus totale, ceux-ci se trouvent coexister indéfiniment avec des formes bacillaires qui ne sont pas des bactéries normales mais des bactéries dont la paroi est profondément altérée par le lysozyme qui y demeure fixé en quantité élevée.

Si l'on tient compte du faisceau d'arguments apporté par divers auteurs, qui permet d'affirmer que les corps sphériques ne possèdent plus de trace de la paroi bactérienne, il s'ensuit que les corps sphériques ne doivent différer des gymnoplastes que par un détail de structure, conséquence d'un épiphénomène ne se manifestant que dans des conditions très étroites de concentration en enzyme. Nous avons tenté de vérifier si cet épiphénomène ne serait pas justement la possibilité pour le lysozyme de se fixer à la surface des gymnoplastes et d'entraîner une insolubilisation superficielle de ces derniers lorsque sa concentration est suffisamment élevée.

**LES SPHÉROPLASTES CONTIENNENT DU LYSOZYME.** — On a pu démontrer que du lysozyme demeure fixé sur les sphéroplastes ou leurs fantômes, par une méthode analogue à celle utilisée dans le cas des angioplastes. Ainsi on a réalisé l'expérience suivante (fig. 4).

A 2,4  $\text{cm}^3$  de la suspension normalisée de *B. megaterium* on ajoute 0,3  $\text{cm}^3$  de solution de saccharose 2 M en tampon phosphate et 0,3  $\text{cm}^3$  de solution de lysozyme en tampon phosphate (5 mg de lysozyme par centimètre cube). La concentration finale est donc égale à 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  pour le lysozyme et à 0,18 M pour le saccharose. La densité optique de départ mesurée sur une dilution au 1/10 est de 0,150. Elle s'abaisse lentement. A la septième minute

elle est de 0,130 ; elle se stabilise alors à cette valeur. Un examen à la trentième minute montre que la suspension ne contient que des sphéroplastes. On centrifuge alors, le lysozyme est dosé dans le surnageant par son activité lytique, on trouve 150 U/cm<sup>3</sup>. Le culot des sphéroplastes est repris dans une solution tamponnée de saccharose 0,18 M de façon à revenir au volume primitif. Après centrifugation, on dose de nouveau le lysozyme dans le surnageant, on procède ainsi à une série de lavages successifs. Comme le volume du culot est d'environ le 1/20 du volume total, en admet-

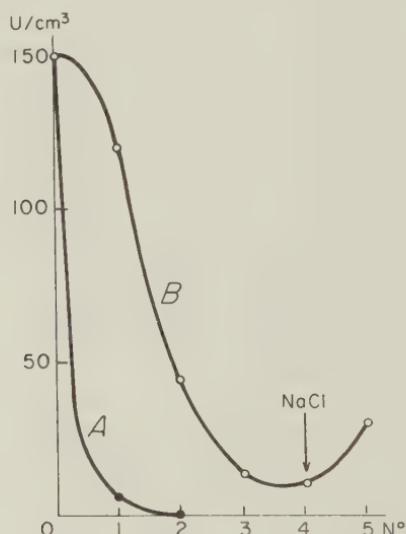


FIG. 4. — En B, lysozyme libéré au cours des extractions successives 1, 2, 3, 4 et 5 (en unités conventionnelles d'activité par centimètre cube). En A, lysozyme qui aurait été extrait s'il ne s'adsorbait pas à la surface des sphéroplastes.

tant que le volume de solution imbibant ce culot soit égal lui-même au 1/20 du volume total (ce qui est évidemment très supérieur à la réalité puisqu'on néglige totalement le volume propre des sphéroplastes), la décroissance de l'activité du lysozyme dans le surnageant de chaque lavage serait représentée par la courbe A de la figure 4. Il est manifeste qu'en pratique, après le second lavage, tout le lysozyme est éliminé. En réalité, les dosages expérimentaux se répartissent selon la courbe B, ce qui témoigne qu'une quantité importante de lysozyme est fixée sur les sphéroplastes, chaque lavage en extrayant une partie. On voit enfin que la destruction des sphéroplastes, par l'addition de chlorure de sodium, libère le lysozyme qui demeurait fixé après 4 extractions.

Une expérience réalisée en l'absence de saccharose sur une suspension d'enveloppes de sphéroplastes donne des résultats analogues.

**EFFET DE LA PROTAMINE.** — Il semble donc que les sphéroplastes ne soient pas autre chose que des gymnoplastes à la surface desquels le lysozyme, en se fixant, constitue une pseudo-membrane sans rigidité. Sous l'influence des forces de tension superficielle l'élément prend la forme sphérique. S'il en est ainsi, on devrait pouvoir obtenir des sphéroplastes dans des conditions où le lysozyme provoque habituellement la lyse complète si on ajoute des protéines basiques autres que le lysozyme.

La figure 5 concrétise les résultats de l'expérience suivante.

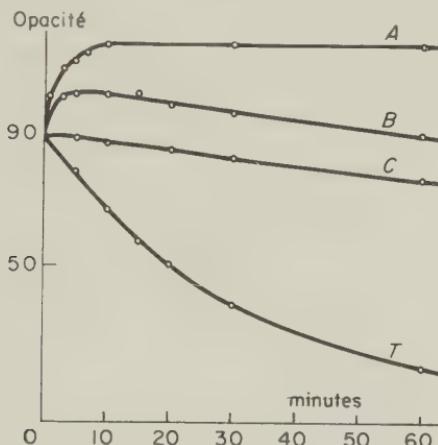


FIG. 5. — Variation, en fonction du temps, de l'opacité des suspensions pour une concentration de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  de lysozyme sans addition de protamine (T), et après addition de  $100$  (C),  $250$  (B) et  $500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  de protamine (A).

On s'est placé dans les conditions normalisées, en l'absence de saccharose, la concentration en lysozyme du milieu réactionnel étant de  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ . En l'absence de protamine la lyse évolue suivant la courbe T et l'examen microscopique ne permet de déceler à aucun moment de sphéroplastes. L'addition de protamine dans le milieu a pour effet de ralentir considérablement ou même d'inhiber la clarification. L'examen microscopique montre que, dans le cas des concentrations de protamine comprises entre  $100$  et  $250 \mu\text{g}$ , des sphéroplastes se constituent en grand nombre au bout de quelques heures et, par la suite, la densité optique ne varie plus.

Tout se passe donc comme si la protamine en se fixant sur les gymnoplastes au moment de leur apparition sous l'influence de doses faibles de lysozyme, provoquait la formation de sphéroplastes, comme l'aurait fait un large excès de lysozyme.

#### DISCUSSION.

On donne habituellement le nom de *membrane cytoplasmique* au cytoplasme constituant la surface externe du protoplasme cellulaire. Il est certain que la dissymétrie des forces qui s'y exercent, comme sur toute surface interphasique, crée une structure superficielle par orientation des molécules d'une part, mais aussi par accumulation de molécules capables d'abaisser la tension superficielle ; aussi y trouve-t-on accumulée une grande proportion des lipides du protoplasme. Quelques bactériologistes ont cru trouver quelques raisons de penser que la membrane cytoplasmique des bactéries constitue un organite cytologique, une véritable membrane, qu'il est possible d'isoler ou d'arracher en « pelant » en quelque sorte le protoplasme.

Les arguments en faveur de cette raison de voir ne sont pas cependant convaincants. Bradfield [2] a montré que les tentatives pour mettre en évidence un tel organite à l'aide de colorations cytologiques spécifiques, sont sans valeur. Quant aux données fournies par la microscopie électronique, d'ailleurs fort peu nombreuses [3, 11, 12, 15], elles ont été obtenues en faisant usage de procédés de préparation brutaux (plasmolyse). Dans ces conditions la membrane cytoplasmique apparaît comme une zone opaque, imperméable aux électrons, alors que, comme le fait remarquer Murray [16], du fait de la richesse en lipides de la couche superficielle du cytoplasme on devrait s'attendre à ce que celle-ci apparaisse sur les micrographies comme une zone très perméable aux électrons. C'est effectivement ce qu'on observe en général sur des coupes de bactéries, mais cette zone paraît diffuse et nullement définie du côté interne.

L'argument essentiel en faveur de l'existence d'une véritable membrane à la surface du protoplasme bactérien, c'est la possibilité d'obtenir des « fantômes » de protoplastes dans le cas des espèces sensibles au lysozyme. Pourtant rien ne paraît plus discutable. Dans le cas de *Micrococcus lysodeikticus* et des sarcines, nous avons eu l'occasion de montrer que le « fantôme » ne peut être considéré comme la membrane cytoplasmique dans son état naturel, mais comme un complexe entre le lysozyme et des éléments pariétaux plus ou moins dégradés par le lysozyme [6]. L'analyse chimique de ces fantômes a d'ailleurs révélé à Gilby et Few [10],

l'existence d'une grande proportion de glucides (15 à 20 p. 100), et notamment de mannose polymérisé sous une forme voisine des mannanes. Plusieurs auteurs [9, 8] n'ont pas trouvé de mannose dans la paroi de *M. lysodeikticus*, mais Krisch [13] en a caractérisé dans un mucopolysaccharide extrait de la bactérie entière. Comme les fantômes contiennent en outre 28 p. 100 de lipides et 50 p. 100 de protéines, on peut admettre que le « fantôme » des protoplastes de sarcines est constitué de la couche superficielle du protoplasme et peut-être de produits de dégradation de la paroi, insolubilisés en formant des complexes avec le lysozyme.

Dans le cas de *B. megaterium*, il apparaît sur les meilleures micrographies [28, 29] et notamment sur les coupes des « fantômes » de protoplastes [29], que des quantités variables de cytoplasme en font partie et que leur limite interne est fort mal définie. Au point de vue chimique, on a trouvé que les « fantômes » contiennent 63 à 69 p. 100 de protéines [30], parmi lesquelles de nombreux enzymes respiratoires, notamment les cytochromes [28], la totalité des déshydrogénases succiniques, DL-lactique,  $\alpha$ -céto-glutarique, et la moitié environ de la déshydrogénase L-malique [23, 24]. Les acides nucléiques que l'on avait cru d'abord s'y trouver [26] sont absents [19, 30]; mais on a caractérisé 1 à 10 p. 100 de lipides, c'est-à-dire 55 à 75 p. 100 des lipides totaux de la bactérie [30]. On n'a identifié aucun élément caractéristique de la paroi — en particulier l'acide diaminopimélique paraît totalement absent — et ceci confirme les données immunologiques [1, 26].

Si dans les fantômes de protoplastes de *B. megaterium*, l'absence d'éléments constitutifs de la paroi paraît bien établie, il n'en demeure pas moins que leur nature exacte demeure problématique. Il résulte de notre étude que les sphéroplastes (protoplastes) ne se forment que dans des limites extrêmement étroites du rapport concentration en lysozyme/concentration en bactéries. Salton déjà avait noté que, malgré une incubation prolongée par le lysozyme, il persistait des structures résiduelles conservant la forme bacillaire et il avançait que peut-être certaines des bactéries possédaient dans leur paroi d'autres constituants que ceux destructibles par le lysozyme. Il travaillait alors avec une suspension bactérienne ayant une densité optique de 0,4 et une concentration de lysozyme de 50  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; ce qui, si on tient compte du rapport enzyme/substrat, correspondrait dans nos expériences à une concentration de 250  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de lysozyme, suffisante pour qu'apparaissent quelques *angioplastes* qui se produisent en grand nombre quand la concentration en enzyme est plus élevée, par un phénomène tout à fait analogue à celui que nous avons décrit dans le cas des sarcines, sous le nom d'« inhibition paradoxale

par excès d'enzyme ». En particulier, nous avons montré que le lysozyme fait partie intégrante aussi bien des « fantômes » de sphéroplastes, que des sphéroplastes eux-mêmes, ou des angio-plastes. Toute action entraînant une libération du lysozyme fixé, entraîne la destruction de ces éléments. Ce résultat paraît en contradiction avec celui de Vennes et Gerhardt [25] qui, utilisant des méthodes immunologiques, n'ont pas pu mettre en évidence le lysozyme sur les protoplastes, mais dans le cas particulier il semble qu'il faille tenir compte des difficultés d'application de la méthode.

En définitive, le processus tel que nous le concevons est le suivant :

Une faible concentration de lysozyme (1 à 100 µg/cm<sup>3</sup>) suffit à détruire la paroi des bactéries, libérant la masse protoplasmique à l'état nu (*protoplaste* vrai, ou mieux *gymnoplasme* pour éviter toute ambiguïté). Cette masse conserve la forme bacillaire et présente un aspect mûriforme caractéristique, mais elle est fragile et se désagrège rapidement, même si la pression osmotique du milieu extérieur est augmentée. La membrane cytoplasmique n'existe donc pas en tant qu'organite cytologique isolable. Quand le lysozyme atteint la concentration de 200 µg/cm<sup>3</sup>, celle-ci est suffisante pour qu'il se forme à la surface des gymnoplastes un mince précipité superficiel entre le lysozyme et des substances de charge électrique opposée. Cette pellicule suffit à éviter la dispersion du protoplasme et, du fait de sa plasticité, le sphéroplaste se constitue (*protoplaste*). Si la pression osmotique interne n'est pas équilibrée, l'exosmose se produit et la pellicule se présente bientôt comme une vésicule vide [« fantôme » du protoplaste]. On peut obtenir la formation de sphéroplastes avec des concentrations beaucoup plus faibles de lysozyme en ajoutant une protéine basique telle que la protamine, phénomène qui a été retrouvé [14] depuis notre première observation [7]. Si la concentration de lysozyme utilisée est encore plus élevée, la pellicule formée entre l'enzyme et la surface du gymnoplasme devient assez rigide pour que l'élément conserve la forme du bacille.

#### RÉSUMÉ.

Comme Tomcsik puis Weibull l'ont établi, on observe, lors de la lyse de *Bacillus megaterium* par le lysozyme, l'apparition de *sphéroplastes* qui ne seraient pas autre chose que la masse protoplasmique dépouillée de la paroi, c'est-à-dire des *protoplastes*. Quand la pression osmotique du milieu n'équilibre pas la pression osmotique interne de la bactérie, le protoplasme diffuse dans le milieu et il ne persiste plus bientôt que des vésicules sphériques, vides, que Weibull désigne sous le nom de « *fantômes* de proto-

plastes ». Ces formations représenteraient la *membrane cytoplasmique* de la bactérie. Nous avons cherché à vérifier si cette interprétation est exacte, en opérant sur la souche KM dans des conditions de concentration en bactéries rigoureusement normalisées. Voici nos observations :

La clarification des suspensions bactériennes suivie au photomètre est inhibée si la concentration enzymatique est supérieure à 500 µg/ml ; entre 500 et 150, après une clarification partielle correspondant à un début de lyse, on observe une opacification secondaire ; au-dessous, ce dernier phénomène n'est plus observé et la lyse peut évoluer jusqu'à une clarification pratiquement totale.

Le microscope électronique révèle qu'entre 500 et 300 µg/ml, dans les conditions où la lyse est inhibée, les bactéries sont cependant profondément modifiées. Du lysozyme en grande quantité fait partie intégrante de ces formations, et la libération du lysozyme par addition de chlorure de sodium entraîne leur solubilisation immédiate. On a donné le nom d'*angioplastes* à ces formations.

Lorsque la concentration en enzyme est comprise entre 300 et 250 µg/ml, des *sphéroplastes* apparaissent en nombre plus ou moins grand parmi les angioplastes. Au voisinage de la concentration de 200 µg/ml, on n'observe que des sphéroplastes. Au dessous de cette concentration en lysozyme, la lyse se produit directement et les sphéroplastes se forment en nombre d'autant plus faible et au bout d'un temps d'autant plus long, que la concentration en lysozyme est plus faible. Les sphéroplastes comme les angioplastes contiennent du lysozyme fixé, mais en moins grande quantité.

L'élévation de la pression osmotique du milieu, par addition de saccharose, modifie le phénomène en augmentant le pourcentage de sphéroplastes, et surtout en les stabilisant (protoplastes). L'étude morphologique dans les conditions de faible concentration en enzyme (inférieure à 100 µg/cm<sup>3</sup>), permet de saisir l'existence transitoire de corps bacillaires manifestement dépouillés de leur paroi et qui sont, seuls, les véritables protoplastes. Nous préférerons les dénommer *gymnoplastes* pour éviter toute ambiguïté.

Ainsi la formation de sphéroplastes apparaît comme un phénomène dépendant étroitement de la concentration relative en lysozyme par rapport à la concentration en bactéries, et semble être la conséquence de la fixation en quantité déterminée du lysozyme à la surface de la masse protoplasmique dénudée à la suite de la destruction de la paroi par le lysozyme (gymnoplastes). Cette opinion est corroborée par le fait que la protamine, c'est-à-dire une protéine basique comme le lysozyme, mais sans activité enzymatique, provoque la formation de sphéroplastes en grand

nombre quand on l'ajoute à du lysozyme en concentration insuffisante pour qu'il s'en constitue.

Il paraît donc que les « fantômes » de protoplastes ne peuvent être considérés comme représentant la membrane cytoplasmique elle-même dans son état naturel.

## SUMMARY

### NATURE OF THE MEMBRANE LIMITING THE PROTOPLASTS OBTAINED BY ACTION OF LYSOZYME ON *Bacillus megaterium*.

Tomcsik, then Weibull, described the appearance of spheroplasts during lysis of *B. megaterium* by lysozyme. These spheroplasts seem to be constituted of protoplasm deprived of cell-walls, i.e. protoplasts. When there is no equilibrium between the osmotic pressure of the medium and that of the bacterium, protoplasm diffuses into the medium, and soon only empty spherical vesicles remain, called « protoplasts ghosts » by Weibull, and supposed to be bacterial cytoplasmic membranes. To verify this interpretation, the author studies the KM strain, working with strictly defined bacterial concentrations. His results are as follows.

The clarification of bacterial suspensions studied by means of a photometer is inhibited if the enzymic concentration is higher than 500 µg/ml ; from 500 to 150 µg/ml, a secondary opacification is observed after a partial clarification corresponding to a beginning of lysis ; at still lower concentrations no opacification is observed, and lysis may continue until practically total clarification.

Electron microscope studies demonstrate that between 500 and 300 µg/ml, if lysis is inhibited, the bacteria are nevertheless deeply altered. They contain a great amount of lysozyme and the release of the enzyme by addition of NaCl provokes immediate clarification of the suspensions. Such formations are called *angioplasts* by the author.

When the lysozyme concentration is comprised between 300 and 250 µg/ml, more or less numerous *spheroplasts* appear among angioplasts. At about 200 µg/ml, only spheroplasts are visible. At lower concentrations, lysis occurs directly, and the lower the concentration, the fewer the spheroplasts and the later their appearance. Spheroplasts like angioplasts contain bound lysozyme, but in lesser amount.

If the osmotic pressure of the medium is raised by addition of sucrose, the phenomenon is modified, the percentage of spheroplasts increases, and they become stable protoplasts. At low

lysozyme concentrations ( $< 100 \mu\text{g/ml}$ ), one notes the transitory existence of bacillary bodies, deprived of cell-walls ; these are the real protoplasts. To avoid any ambiguity, the author calls them *gymnoplasts*.

So the formation of spheroplasts appears to be closely dependent on the ratio between lysozyme and bacterial concentrations, and to result from the fixation of a certain amount of lysozyme on the surface of the denuded protoplasmic bodies deprived of their cell-walls by the lysozyme (gymnoplasts). This interpretation is confirmed by the following fact : in low lysozyme concentrations, the appearance of spheroplasts is favoured by addition of protamin, a basic protein like lysozyme, but deprived of enzymic activity.

Therefore, protoplasts ghosts cannot be considered as cytoplasmic membrane in their normal state.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAUMANN-GRACE (J. B.) et TOMCSIK (J.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **17**, 227.
- [2] BRADFIELD (J. R. G.). *Bacterial Anatomy, Sixth Symp. Soc. gen. Microbiol.*, Londres, 1956, University Press, Cambridge, 1956, 296.
- [3] CHAPMAN (G. B.) et KROLL (A. J.). *J. Bact.*, 1957, **73**, 63.
- [4] COLOBERT (L.) et LENOIR (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 74.
- [5] COLOBERT (L.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, 1155.
- [6] COLOBERT (L.). *C. R. Soc. biol.*, 1957, **151**, 114.
- [7] COLOBERT (L.). *Résumé VII<sup>e</sup> Congr. intern. Microbiol.*, Stockholm, 1958. Tunéval, édit., Uppsala, 1958, 25 d, 419.
- [8] COLOBERT (L.). *J. Path. Biol.*, 1960, **8**, 1023.
- [9] CUMMINS (C. S.). *Intern. Rev. Cytol.*, 1956, **25**, 50.
- [10] GILBY (A. R.), FEW (A. V.) et MAC QUILLEN (K.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **29**, 21.
- [11] KELLENBERGER (E.) et RYTER (A.). *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, **4**, 323.
- [12] KNAYSI (G.). *Elements of bacterial cytology*, 2<sup>e</sup> édit., Cornell Univ. Press, New York, 1951.
- [13] KRISCH (K.). *Z. physiol. Chem.*, 1958, **311**, 131.
- [14] MAGER (J.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **36**, 529.
- [15] MURRAY (R. G. E.). *Can. J. Microbiol.*, 1957, **3**, 531.
- [16] MURRAY (R. G. E.). In *The Bacteria*, par Gunsalus et Stanier, Academic Press, New York et Londres, 1960, **1**, 35.
- [17] NORTHCOTE (D. H.) et HORNE (R. W.). *Biochem. J.*, 1952, **51**, 232.
- [18] PERKINS (M. R.) et ROGERS (M. J.). *Biochem. J.*, 1958, **69**, 15 p.
- [19] MAC QUILLEN (K.). In *The Bacteria*, par GUNSALUS et STANIER, Academic Press, New York et Londres, 1960, **1**, 249.
- [20] MAC QUILLEN (K.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, **6**, 66.
- [21] ROBINOW (C. F.) et MURRAY (R. G. E.). *Exp. Cell. Res.*, 1953, **4**, 390.

- [22] STORCK (R.) et WACHSMAN (J. T.). *Biochem. J.*, 1957, **66**, 19 p.
- [23] STORCK (R.) et WACHSMAN (J. T.). *J. Bact.*, 1957, **73**, 784.
- [24] TOMCSIK (J.) et GUEX-HOLZER (S.). *Schweiz. Z. allg. Pathol.*, 1952, **15**, 517.
- [25] VENNES (J. W.) et GERHARDT (P.). *Science*, 1956, **124**, 435.
- [26] WEIBULL (C.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 688.
- [27] WEIBULL (C.). *J. Bact.*, 1953, **66**, 696.
- [28] WEIBULL (C.) et THORSSON (K. G.). *Proc. Stockholm Conference on Electron Microscopy*, 1956, 266.
- [29] WEIBULL (C.). *Acta Chem. Scand.*, 1957, **11**, 881.
- [30] WEIBULL (C.) et BERGSTRÖM (L.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1958, **30**, 340.

**LES LEPTOSPIROSES HUMAINES A *L. POMONA*  
ET *L. MITIS* JOHNSON 1942  
(MALADIE DES PORCHERS)**

par B. KOLOCHINE-ERBER et M. MAILLOUX (\*).

(Institut Pasteur)

La maladie des porchers, ou leptospirose à *L. pomona*, est une leptospirose bénigne, bien individualisée par son épidémiologie.

Elle a été reconnue d'abord cliniquement en Suisse et en Savoie. Dès 1914, Bouchet [9] observe les trois premiers cas de « pseudo-typo-méningite » ; Muller [49] en 1932 signale une « grippe des laiteries » ; Urech [68] en 1933 montre nettement la relation entre l'agent causal et le métier de porcher et nomme l'affection « maladie des jeunes porchers ». Penso, en 1936, publie une note sur « un méningotyphus éruptif sporadique bénin à caractère professionnel » [51 à 54]. Durand, Giroud, Larrivé et Mestralllet reproduisent la maladie chez l'homme et le passage au porc, au singe et aux rongeurs en 1936 ; ils supposent que la maladie est due à un virus [22]. Mais l'agent n'est toujours pas isolé.

De nombreux auteurs consacrent durant cette période, de 1933 à 1938, travaux et thèses à la maladie des porchers : Demole [18], Bouchet [9], Bocca [6], Charleux [14, 15], Raymond [56], Wacker [70], Froin [25], Lavabre [42], Ledoux [43, 44] ; en 1940, Reysz [57] présente une thèse sur la question.

C'est en Australie, dans la province de Pomona, que des cas de « fièvre des sept jours » ont été trouvés par Clayton, Derrick et Cilento en 1937 [16] chez des personnes employées dans les laiteries ; une souche de leptospires fut isolée. Puis Derrick [20] en 1942, reprenant l'étude sérologique identifie un nouveau séro-type, différent des types connus, pour lequel il propose le terme de *L. pomona australis* C. En 1939, Mochtar et Collier [48], dans les environs de Batavia, trouvent un leptospire, plus tard identifié à *L. pomona*, chez les porcs et les personnes travaillant dans les porcheries. En 1940, Johnson [37] cultive un autre leptospire : *L. mitis* à partir du sang d'un bouvier de Queensland. Babudier

(\*) Manuscrit reçu le 25 juillet 1960.

et Bianchi [5], en 1940, isolent *L. pomona* chez des travailleurs de rizières en Italie. Savino et Rennella [62] isolent chez des porcs d'Argentine, en 1944, un leptospire différent de *L. pomona* et pour lequel les auteurs proposent *hyos* comme nom d'espèce, doublant ainsi la dénomination de *mitis* (1).

Gsell, en 1944, montre que *L. pomona* est l'agent de la maladie des jeunes porchers [28 à 34] dont l'entité clinique avait été reconnue par Bouchet en 1914 en Haute-Savoie. Gsell et Wiesmann [35] rassemblent dix cas de maladie des jeunes porchers due à *L. mitis* Johnson (*L. hyos*).

Une fois l'agent étiologique déterminé, les études cliniques et sérologiques foisonnent. Abdoucheli [1], Gaspardis [26], Goin [27] choisissent ce sujet pour des thèses. Parmi les autres publications, citons en Europe les travaux de Andrieu et coll. [2], Austoni et coll. [3, 4]; Boquien et coll. [7, 8]; Boulet et coll. [10], Brion et Bertrand [12], Combiesco [17], Deparis et coll. [19], Gsell [28 à 35], Kemenes [38], Kmety et coll. [39], Leger, David Chausse et Aubin [45], Mattei et coll. [46], Michaud [47], Parnas [50], Planchu [55], Roch et coll. [58 à 61], Sclafaser [65], Siguier et Poulet [66], Schweitzer [64], Schmidt et Giovanella [63], Topciu et Duma [67]. Maintenant on connaît la répartition pratiquement mondiale de *L. pomona*.

\*\*

En 1949, notre collègue P. Giroud avait donné à l'un de nous du matériel (sérum et organes inclus dans la paraffine) provenant d'expériences qu'il avait poursuivies en 1938-1939 pour l'étude de la maladie expérimentale par passage de lapin à lapin et dont les résultats ne faisaient que confirmer l'idée de maladie à virus, conclusion des travaux de 1936 de Durand, Giroud, Larrive et Mestrallet [22].

Seuls quelques échantillons de sérum ont apporté une réponse significative. Les lapins étaient sacrifiés un certain nombre de jours après l'inoculation. Pour 14 échantillons de sang, deux fois ont été trouvés des séro-diagnostic positifs (sérum 6 et 14) pour *L. pomona*: l'un dépasse 1/10 000 pour *L. australis* C et une souche isolée par le Dr Gsell (l'inoculation remontait à deux mois

(1) La question a été mise au point en 1952 par le Comité International des Leptospiroses. Tenant compte du fait que le qualificatif *mitis* était appliqué, à tort, à un autre leptospire (Mino, rizières, 1938), la synonymie devait disparaître : *hyos* devait remplacer *mitis*; la souche devenait alors *L. hyos* Savino et Rennella 1944. Mais le terme ancien pouvait être conservé s'il était toujours accompagné du nom de l'auteur et de la date : *L. mitis* Johnson 1942 puisque c'était un synonyme. La plupart des auteurs emploient la première de ces désignations ; ici nous avons choisi la seconde (B. K. E. et M. M.).

et trois mois et demi). Pour deux autres les chiffres atteignent seulement 1/1 000. A cette époque où l'on commençait seulement à connaître le rôle de *L. pomona* dans la maladie des porchers, ces chiffres avaient paru trop faibles pour être retenus, surtout les seconds ; mais maintenant on sait que même le taux de 1/1 000 est significatif, d'autant plus s'il est accompagné de lyse. Les autres sérum de lapins n'agglutinaient pas *L. pomona*, mais pour la plupart ils avaient été obtenus une dizaine de jours après l'inoculation ; peut-être les anticorps n'étaient-ils pas encore développés, ou mieux il faut penser, connaissant la fragilité des leptospires pathogènes dans le milieu extérieur, qu'au cours d'une série, un passage a été fait avec des produits d'où déjà les leptospires avaient disparu. Quant au matériel fixé et inclus à la paraffine, rien ne peut être retenu. Indépendamment de l'état des leptospires au moment de la fixation, le séjour dans le Bouin ne pouvait que détruire les leptospires, sensibles à toute réaction acide. La recherche a été négative, et même des files de granules sur un corps de leptospire lysé (fantômes de leptospire) n'ont pu être retrouvées. C'est donc grâce à quatre sérum de lapins avec lesquels l'agglutination de *L. pomona* fut positive que l'on est autorisé à dire que P. Giroud et ses collaborateurs avaient attribué à un virus une maladie à leptospire. Du reste, dans la plupart des travaux publiés où il s'agit de « maladie à virus », si l'on remplace ce terme par celui de « leptospires », si l'on suit bien les protocoles d'expériences, si l'on précise certains détails et conditions (temps de prélèvement, choix des organes) on remarque bien vite que le mot « leptospirose » peut remplacer l'autre pour en faire un travail d'actualité. La lecture de certaines thèses en particulier est fort instructive à ce propos.



Chez l'homme, cliniquement, la maladie évolue de façon cyclique. L'incubation, qui doit durer de huit à quinze jours (un mois parfois), est silencieuse ainsi que la période d'invasion.

Le début est brusque, presque brutal, et on est donc d'emblée à la période d'état.

La première phase ou *phase intestinale* revêt une allure presque typhoïdique : température à 39°, pouls à 100-110, céphalée constante, douleurs musculaires, faciès violacé, sudation abondante, conjonctivite à des degrés variables. Sur ce tableau dominent les signes digestifs et intestinaux : langue saburrale, selles diarrhéiques dont la sétidité spéciale rappellerait celle des déjections du porc ; urines albumineuses. A l'examen, l'abdomen est ballonné, météorisé ; parfois on note une hépatomégalie et

splénomégalie toujours légères. Il n'y a pas d'ictère, dans la règle.

A la fin de cette phase, vers le troisième jour, apparaît un exanthème maculo-papuleux rosé, siégeant au niveau de l'abdomen, des flancs, et à la face interne des cuisses. Il persistera cinq à six jours : c'est le « méningo-typhus éruptif » de Penso [51, 52]. Durant toute cette période le malade est abattu, prostré, soit pendant quatre jours environ.

Puis survient la *phase de rémission* : chute de la température, bien-être qui dure un à trois jours.

La *phase méningée* lui fait suite vers le cinquième ou sixième jours. La température remonte à 40-41° et s'y maintient pendant cinq ou six jours, le pouls reste à 90 ; il y a donc dissociation du pouls et de la température. La céphalée aiguë se généralise. Les signes méningés manquent rarement : raideur de la nuque, signe de Kerning, de Brudzinski, photophobie, absence de paralysie périphérique. Le L. C.-R. donne peu de renseignements cliniques : liquide clair, hypertendu. L'examen montre une hyperalbuminorrhachie légère et une réaction cellulaire à prédominance lymphocytaire (30-40 éléments). Au point de vue sanguin, on note une leucocytose avec polynucléose. Cette phase dure environ cinq à six jours.

Quoi qu'il en soit l'évolution est toujours favorable. Vers le neuvième ou dixième jour la température revient à 37° et le malade entre en convalescence. Les incidents sont rares. Gsell signale la possibilité de complications oculaires (irido-cyclite) [32]. Le pronostic est cependant bénin.

Cette évolution cyclique : début brutal, phase intestinale pseudo-typhoïdique, phase de rémission, puis phase méningée, est caractéristique de l'affection ; c'est d'elle que vient la décision de pratiquer les examens de laboratoire pour confirmer le diagnostic.

Parmi les nombreuses observations que nous possédons nous résumons ici succinctement les plus intéressantes, pour lesquelles nous avons eu les renseignements les plus complets.

I. Dans ce premier groupe, sont réunies quelques observations dont le séro-diagnostic montre indiscutablement une leptospirose à *L. pomona*.

1<sup>o</sup> M. T. M..., tueur aux abattoirs de Nancy, présente en janvier 1953 une fièvre élevée avec conjonctivite et herpès périlabial. Il existe une discrète réaction méningée. Au huitième jour on note un clocher thermique. L'agglutination-lyse est positive pour *L. pomona* au-delà du 1/10 000.

2<sup>o</sup> M. G. R..., employé aux abattoirs de Bordeaux, a été hospitalisé en août 1953 pour syndrome fébrile accompagné de céphalées, douleurs diffuses, asthénie et rougeur conjonctivale. Le séro-diagnostic positif pour *L. pomona* atteint le 1/10 000.

3<sup>o</sup> M. L. C..., porcher qui travaille près d'un cours d'eau où pullulent les rats, entre à l'hôpital de Dijon en septembre 1953. Le cas est étiqueté méningite lymphocytaire ; urée = 0,93. Pendant la maladie il présente des hémorragies sous-conjonctivales. Le séro-diagnostic est positif pour *L. pomona*.

4<sup>o</sup> M. B. R..., porcher fromager, est hospitalisé à Lons-le-Saunier, en septembre 1953, pour angine, épitaxis. Les signes notés sont : fièvre à 39°-40°, conjonctivite, signes méningés, constipation. La fièvre cède au traitement antibiotique, mais au quatorzième jour on note une poussée fébrile. Le malade conserve une raideur méningée. Le séro-diagnostic est positif pour *L. pomona*, le titre dépasse le 1/10 000.

5<sup>o</sup> M. L. M..., cultivateur en Vendée, est atteint en mai 1954 de méningite. Le séro-diagnostic atteint le 1/10 000 pour *L. pomona*.

6<sup>o</sup> M<sup>me</sup> Ni..., habitant les Deux-Sèvres, présente un syndrome fébrile en janvier 1955 avec azotémie, légère réaction méningée. Le séro-diagnostic montre une agglutination-lyse au 1/10 000 pour *L. pomona*.

7<sup>o</sup> M. R. B..., cultivateur dans la région de Toulouse, fait en août 1954 une néphrite et un syndrome méningé. L'agglutination-lyse positive pour *L. pomona* atteint le 1/10 000.

8<sup>o</sup> M. G. L..., saigneur de porcs aux abattoirs de Béziers, est hospitalisé en septembre 1954 pour méningite lymphocytaire. Le séro-diagnostic pratiqué sur son sérum montre un titre qui atteint le 1/10 000 pour *L. pomona*.

9<sup>o</sup> M. D. R..., travaillant dans l'industrie laitière, tombe malade le 11 juin 1955 : anorexie, vomissements, douleurs abdominales, fièvre à 40°, injection conjonctivale ; urée, 1,15 g. Le quinzième jour, clocher thermique. Le séro-diagnostic montre une agglutination-lyse positive au 1/5 000 pour *L. pomona*.

10<sup>o</sup> M. S..., travaillant dans une porcherie à Bourg-en-Bresse (Ain), est hospitalisé le 16 août 1954 pour état méningé fébrile. Le séro-diagnostic est positif pour *L. pomona* à 1/1 000.

11<sup>o</sup>. M. R. A..., dont le père est fromager à Thoiry (Ain), s'occupe des porcs pendant ses loisirs. Il est hospitalisé (1954) pour syndrome fébrile qui cède à la pénicilline. Une rechute est traitée par l'auréomycine. Le séro-diagnostic révèle une leptospirose à *L. pomona*.

12<sup>o</sup> M. V. J..., boucher, est hospitalisé en mars 1959 à Bourg-en-Bresse pour néphrite hématurique et urémigène accompagnée de fièvre. Le premier séro-diagnostic est faiblement positif pour *L. pomona* puis devient net quinze jours après.

13<sup>o</sup> M. P. M..., travaillant dans une porcherie près de la Rochelle, se plaint en décembre 1959 de céphalées, douleurs lombaires et abdominales, avec fièvre à 39°. L'examen clinique ne révèle rien de spécial. Le séro-diagnostic prouve une leptospirose à *L. pomona*.

II. Dans ce deuxième groupe, les observations démontrent que le diagnostic du sérotype spécifique n'est pas toujours aisé, quand il existe des coagglutinines.

14<sup>e</sup> M<sup>me</sup> Q..., travaillant dans une porcherie, présente en février 1954 une fièvre à 40°. L'examen montre des signes méningés et un L. C.-R. clair. Le séro-diagnostic décèle une agglutination-lyse positive pour *L. pomona* et *L. mitis*.

15<sup>e</sup> M. K... (Nancy), en octobre 1957, est atteint de méningite lymphocytaire. Un seul séro-diagnostic montre une agglutination-lyse également positive pour *L. mitis* et *L. pomona*.

16<sup>e</sup> M. P. G..., porcher aux environs de Paris (hôpital de Bicêtre), présente en décembre 1953, brutalement, un syndrome infectieux : température à 40°, céphalées, myalgies, syndrome méningé. Le premier séro-diagnostic est douteux pour *L. pomona* et *L. mitis*, puis le deuxième examen est en faveur de *L. pomona*.

17<sup>e</sup> M. D. C..., employé à la porcherie de Nozay (S.-et-O.), présente en juin 1953 une fièvre élevée, céphalées, vomissements, sueurs, douleurs diverses. L'examen montre un syndrome méningé. Le premier séro-diagnostic montre un taux de 1/10 000 pour *L. mitis*, le deuxième dépasse le 1/10 000 toujours pour *L. mitis*, avec coagglutinines faibles pour *L. pomona* et *L. grippo-typhosa*.

18<sup>e</sup> M. La..., directeur de porcherie à Jonzac (Charente-Maritime), présente en juin 1953 un syndrome fébrile avec signes méningés. Le séro-diagnostic montre une agglutination-lyse positive au 1/5 000 pour *L. pomona*, au 1/1 000 pour *L. mitis* et au 1/1 000 pour *L. ballum*.

19<sup>e</sup> M. Lo..., porcher à Bourg-en-Bresse (Ain), présente en août 1957 une fièvre avec de la diarrhée. L'examen révèle une néphrite. Le séro-diagnostic montre une agglutination-lyse au 1/1 000 pour *L. pomona* avec coagglutinines pour *L. australis*.

20<sup>e</sup> M. Da..., s'occupe d'agriculture dans l'Ariège et pratique l'élevage des porcs. Le 12 mai 1959 il est pris de céphalée violente, avec rachialgies, vomissements, la fièvre monte à 40°6. Il a de la diarrhée, l'abdomen est douloureux. Il existe un signe de Kernig. Quatre jours plus tard, un exanthème apparaît sur le thorax. Vers le septième jour, clocher fébrile à 38°2. Il y a de l'albuminurie. Les séro-diagnostic montrent une agglutination-lyse forte pour *L. australis* et *L. pomona* au 1/1 000. Au deuxième examen, le phénomène de zone au 1/10 signe la spécificité de *L. pomona*.

21<sup>e</sup> M. A. J... abatteur de porcs à Toulouse, présente brutalement en août 1954 un état fébrile avec syndrome méningé, signes digestifs. Le séro-diagnostic est positif au 1/1 000 pour *L. pomona* et au 1/500 pour *L. canicola*.

22<sup>e</sup> M. Di..., militaire, ayant des contacts avec les porcs, est hospitalisé pour uvéite bilatérale d'allure subaiguë, en octobre 1954. Deux séro-diagnostic pratiqués montrent une leptospirose à *L. pomona* avec coagglutinines pour *L. australis*.

III. Ces trois derniers cas sont les plus intéressants ; ils démontrent l'ascension progressive du taux des anticorps pour *L. pomona* et la disparition parallèle des coagglutinines étagée sur une période assez longue.

23° M. T. S..., ancien cultivateur, ouvrier boucher aux abattoirs des usines Morey à Cuiseaux (Saône-et-Loire), présente en octobre 1953 un syndrome méningé fébrile. Un premier séro-diagnostic montre un taux égal pour *L. pomona* et *L. australis*, puis au deuxième examen les coagglutinines pour *L. australis* ont pratiquement disparu, et *L. pomona* atteint le 1/10 000.

24° M. P. H..., porcher à Villejuif (2), est brusquement malade le 5 septembre 1955 avec fièvre, vomissements, arthralgies, sans typhos, ni signes méningés, ni ictere.

L'urée est à 0,80 g p. 1 000. Les différents séro-diagnostic faits le 20 septembre, les 4, 11 et 24 octobre, montrent les résultats suivants : premier résultat douteux pour *L. ictero-hemorragiae* et *L. canicola*; deuxième toujours douteux pour *L. ictero-hemorragiae* et *L. canicola*, mais positif à 1/1 000 (lyse 1/100) pour *L. pomona*; troisième positif à 1/5 000 (lyse 1/500) pour *L. pomona*, *L. ictero-hemorragiae* et *L. canicola* au 1/1 000; quatrième positif pour *L. pomona* (1/5 000) [lyse 1/1 000], les taux d'anticorps pour *L. ictero-hemorragiae* et *L. canicola* n'atteignant plus 1/100.

La formation des agglutinines pour *L. pomona* est tardive (deuxième examen) : la réponse est douteuse pour trois sérotypes ; c'est seulement à partir du troisième examen que la spécificité de *L. pomona* apparaît et au quatrième qu'elle devient manifeste.

25° M. T. P..., abatteur de porcs à Aubervilliers (Seine), est hospitalisé à la fin de juillet 1954 pour température à 40° brutalement. À l'entrée à l'hôpital Lariboisière la fièvre est à 39° avec céphalée, myalgies, urée à 1,10. Les premiers séro-diagnostic sont positifs pour *L. canicola* et *L. pomona* au 1/10 000. Mais grâce aux examens répétés (6 en tout) faits à plusieurs semaines d'intervalle, du 9 août 1954 au 4 janvier 1955, cette leptospirose fut attribuée à *L. pomona*, les coagglutinines pour *L. canicola* étant abaissées à un taux très faible, tandis que pour *L. pomona* le phénomène de zone restait présent au 1/10.

Pour les observations rapportées dans le premier groupe le séro-diagnostic n'offre aucune difficulté : il n'y a pas de coagglutinines. La réponse est positive à un taux élevé : huit fois elle atteint ou dépasse 1/10 000, une fois la limite est au 1/5 000 et une fois au 1/1 000. Les premiers de ces chiffres sont largement suffisants pour assurer la spécificité du séro-diagnostic, le dernier est juste satisfaisant. C'est vers la troisième semaine de la maladie

(2) Cet exemple est celui qui a été cité par Deparis et coll. [19], mais il devait figurer ici, en bonne place, puisque c'est un cas bien étudié parmi tous ceux que nous connaissons. Que le Dr Deparis soit remercié de nous avoir aidés à étudier la sérologie de ce malade.

que le taux des agglutinines marque la spécifité ; il décroît ensuite. La même observation vaut pour *L. mitis* J.

Mais les cas ne sont pas toujours aussi simples et des coagglutinines peuvent être présentes et rendre douteuse la réponse pendant un temps plus ou moins long. Un second examen est souvent nécessaire : tel résultat qui laissait hésiter entre *L. pomona* et *L. mitis*, entre *L. pomona* et *L. australis*, entre *L. pomona* et *L. canicola* devient positif pour *L. pomona* quelques jours plus tard. Toute sécurité est acquise lorsqu'apparaît au 1/10 le phénomène de zone pour le sérotype qui donne la réponse positive, *L. pomona* ou *L. mitis* dans le présent travail ; pour les autres sérotypes les amas d'agglutination sont abondants dès le 1/10 (cas 20 et 21). Quand l'agglutination reste égale pour plusieurs sérotypes, la réponse doit rester douteuse si le séro-diagnostic n'est pas recommencé quelques jours plus tard. Car l'importance d'un diagnostic sérologique sûr est grande chaque fois qu'il s'agit d'une maladie professionnelle.

Les trois cas du dernier groupe sont significatifs à ce point de vue. Le cas 23 est intermédiaire, il montre assez vite quelle est la réponse positive et il pourrait même être classé dans le groupe II puisqu'un second examen suffit pour reconnaître le rôle de *L. pomona*. Pour le cas 24, en l'espace de deux mois, du 21 août au 24 octobre, quatre séro-diagnostic ont permis d'affirmer finalement le rôle de *L. pomona*, puisque la réponse restait litigieuse entre ce sérotype et *L. canicola*. Quant au cas 25, il a même fallu six examens successifs échelonnés du 9 août 1954 au 4 janvier 1955 avant de qualifier la maladie du sujet de leptospirose à *L. pomona*.

Est-il utile de remarquer que, pour les deux exemples les plus complexes et les plus difficiles à préciser, les coagglutinines existaient entre *L. pomona* et *L. canicola* ; la réponse paraissait d'abord positive pour *L. canicola*, mais les examens répétés ont réussi à mettre en évidence le rôle de *L. pomona* pour les deux porchers. Il n'y a pas de rapport de groupe entre ces deux sérotypes, du reste un des exemples donnés ci-dessus (cas 21) montre un cas où la dissociation a été facile entre les deux sérotypes. Il s'agit sans doute d'une simple coïncidence. Mais ces remarques conduisent à examiner de plus près les séro-diagnostic pour lesquels il y a des coagglutinines multiples entre des leptospires appartenant à des groupes différents. La concomitance des anticorps entre *L. pomona* et *L. mitis* est fréquente ; la recherche des anticorps agglutinants dans les sérums des porcs nous l'a montrée, et Fraga de Azevedo avec ses collaborateurs [23, 24] l'a aussi noté au Portugal. La présence d'autres anticorps pour des leptospires n'est pas rare, associée à l'un ou l'autre sérotype des

porcs. On peut penser qu'il y a eu une affection double dans le temps et que les anticorps du premier leptospire infectieux ont diminué tandis que ceux du second subsistent à un taux plus élevé, puisque la maladie est plus récente et qu'il n'y a pas de vaccination entre des leptospires appartenant à des séro-groupes différents. Mais, si le taux des anticorps est élevé, au même moment, pour plusieurs sérotypes, faut-il invoquer une affection simultanée par de multiples leptospires ? Et si l'on passe à l'existence de trois séries de coagglutinines, ou même davantage, la réponse devient encore plus difficile à interpréter.

Il est facile de remarquer que presque tous les malades dont l'observation est rapportée ci-dessus s'occupent plus ou moins directement de porcs : cultivateur, agriculteur, éleveur, employé aux abattoirs, boucher, employé dans une laiterie, une conserverie, fromagerie. L'incidence professionnelle est donc évidente, elle n'est plus discutée aujourd'hui. C'est pourquoi la connaissance du métier du malade est très importante et oriente le choix des sérotypes employés pour le séro-diagnostic.

## \*\*

Nous avons groupé, depuis 1945, les séro-diagnostic demandés pour la maladie des porchers au Laboratoire des Leptospiroses à l'Institut Pasteur (tableau I). Ces sérum ont été examinés vis-à-vis de *L. pomona* et *L. mitis* et de plusieurs autres sérotypes, le choix étant fixé d'après la profession des malades et la provenance du sérum. Leur nombre n'a cessé de croître depuis 1945, pour atteindre en 1959 près de 1 000 par an. Le nombre de séro-diagnostic positifs pour *L. pomona* depuis 1945, s'élève à 143 ; le nombre des réponses positives se stabilise aux environs de 13 par an à partir de 1950 ; cela fait au total à peu près 4 p. 100 de séro-diagnostic positifs sur le nombre d'exams pratiqués pour *L. pomona*. Pour *L. mitis* étant donné leur nombre peu élevé, il n'a pas été possible d'établir une moyenne significative pour ces séro-diagnostic.

Si l'on groupe ces chiffres par mois (fig. 1), le nombre des exams, sur l'ensemble des quinze ans, atteint puis dépasse 300 en juillet-août jusqu'en décembre, alors qu'il est inférieur à ce nombre dans la première moitié de l'année. Parallèlement le nombre de séro-diagnostic positifs est plus élevé pendant cette période août-septembre à novembre-décembre, avec un maximum en novembre. Ces observations sont en faveur d'une importance automno-hivernale de la maladie humaine à *L. pomona* (fig. 1).

L'étude des cas humains conduit aux mêmes conclusions que celles obtenues pour les sérum de porcs en ce qui concerne les

zones favorables à la présence de *L. pomona* (tableau II). Le tableau II montre la vaste répartition de la leptospirose humaine à *L. pomona* et indique la densité régionale des cas, calculée sur une période de quinze années. Les malades des hôpitaux pari-

TABLEAU I. -- Séro-diagnostic humains selon les années (1945-1960).

Année	Sérodiagnostics positifs	Sérodiagnostics douteux	Total	Nombre d'examens pratiqués pour <i>L. pomona</i>
1945	1	0	1	6
1946	0	0	0	14
1947	3	1	4	20
1948	5	1	6	41
1949	0	0	0	67
1950	12	3	15	137
1951	10	6	16	133
1952	10	2	12	128
1953	14	4	18	154
1954	14	2	16	174
1955	9	4	13	192
1956	10	2	12	276
1957	2	4	6	471
1958	5	5	10	692
1959	4	10	14	962
	99	44	143	3.467

siens proviennent de porcheries de la région parisienne, rarement de la province.

Dans une vaste région comprenant la Savoie, le Lyonnais, la Bourgogne, la Franche-Comté, on trouve en quinze ans, plus de cas positifs que l'on n'en identifie dans l'ensemble des hôpitaux de la région de Paris pendant le même temps (tableau II).

Dans les provinces, les sérums sont adressés par les hôpitaux et les laboratoires régionaux par des médecins praticiens ; de certaines villes les envois de sérum sont fréquents et le nombre des cas positifs atteint à Bourg-en-Bresse, par exemple, 10 réponses. Entre Nantua et Gex nombreux sont les villages

où des cas sont connus : Thoiry fournit 6 réponses positives ; Le Poizat, Collonges, Challex apportent leur contribution. Au sud de la frontière, la Haute-Savoie est riche en exemples. Si Cruseilles est connu par les travaux de Bouchet, la ville d'Annemasse doit être citée avec 14 sérum positifs pour des cas régionaux proches. Le point le plus septentrional bourguignon d'où a été reçu un sérum positif est Chablis, dans l'Yonne, mais les cas sont

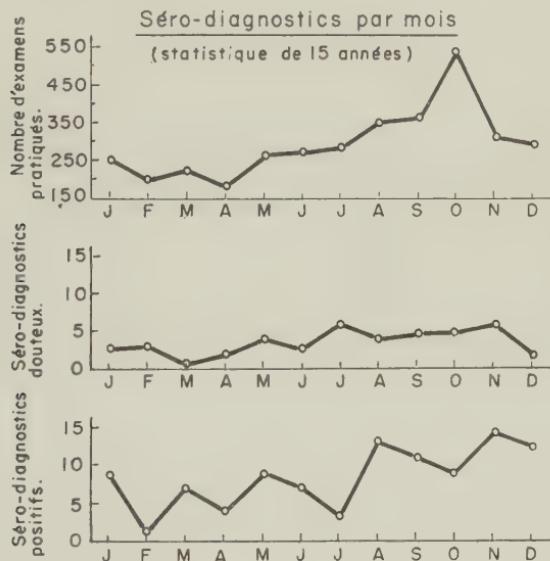


FIG. 1. — Courbes représentant le nombre de séro-diagnostic par mois (*L. pomona*) sur quinze ans.

de moins en moins nombreux à mesure que l'on s'éloigne de la frontière suisse. La région lyonnaise est trop voisine de la Savoie pour ne pas apporter son contingent ou recevoir des examens à faire. Les hôpitaux et les laboratoires de Lyon ont fourni 4 cas à l'Institut Pasteur de Paris et l'Institut Pasteur de Lyon compte aussi 4 réponses positives en 1958 et 1959 ; 2 pour Annemasse, 2 pour Annecy (3).

(3) Renseignements fournis par le Dr A.-L. Courtieu, Chef de Laboratoire dans le Service de Microbiologie à l'Institut Pasteur de Lyon, que nous remercions ici. Ces quatre cas s'ajoutent à ceux que nous avons trouvés, mais ne sont pas comptés.

Sur la côte atlantique, dans les Charentes, la Vendée, la région nantaise, les cas de maladie humaine ne sont pas rares, mais la densité est moins forte que dans l'ensemble des quatre provinces

TABLEAU II. — Répartition en France, selon les régions, des cas humains de leptospirose à *L. pomona*, de 1945 à 1960.

Hôpitaux de Paris.....	16
Hôpitaux de la région parisienne...	10
Normandie.....	4
Bretagne (région Nantes)....	9
Touraine.....	2
Anjou.....	1
Vendée.....	1
Poitou.....	9
Charentes.....	7
Aquitaine (région Bordeaux). .	3
Gascogne (région Toulouse)..	5
Ariège.....	1
Languedoc (Montpellier).....	3
Champagne.....	2
Lorraine.....	2
Franche-Comté.....	9
Bourgogne.....	23
Bourbonnais.....	1
Lyonnais.....	4
Savoie.....	27
Dauphiné.....	6
Vaucluse.....	1
Provence.....	3

citées plus haut. Des foyers isolés sont disséminés sur le territoire français un peu partout ; le nord et le centre paraissent plus ou moins indemnes, mais c'est peut-être parce que les recherches n'ont pas été assez nombreuses.

Les leptospiroses paraissaient être à peu près inconnues dans la région de l'Ain et de la Savoie, avant la connaissance du rôle de *L. pomona* ; depuis, les examens portant systématiquement sur ce leptospire ont appris que la maladie y était au contraire présente. Dans les régions où les cas de maladie humaine sont les plus fréquents, des recherches poursuivies pour d'autres buts [41] ont mis en évidence la présence d'agglutinines pour *L. pomona* dans des sérums de porcs et de chevaux (voir la carte ci-jointe et la légende).

On peut ajouter à ces remarques une notion relativement récente : celle de la contamination des eaux de surface quand elles servent de déversoirs aux eaux de porcheries souillées et la transmission effective de *L. pomona* au chien et par le chien. Ces deux derniers points n'ont pas encore fait l'objet d'études en France.

★ ★

Le rôle économique, social et médico-légal des leptospiroses d'origine porcine n'est plus nié aujourd'hui. Il est variable suivant les pays et d'importance différente suivant les régions d'un même pays. Pour la France, absence (?) dans les Flandres par exemple,



FIG. 2. — Carte de France sur laquelle figurent les noms des villes dont les hôpitaux et les laboratoires ont demandé des séro-diagnostic de leptospirose humaine qui ont été positifs ou douteux pour *L. pomona*. Les cercles marquent les départements où des séro-diagnostic ont été positifs pour des sérums de porcs (Kolochine-Erber et Mailloux [41]). Les carrés désignent les départements où des séro-diagnostic positifs pour *L. pomona* ont été trouvés pour des chevaux (recherches de P. Rossi et B. Kolochine-Erber, de 1952 à 1956, fiches de travail).

et présence dans les régions d'élevage (Normandie, Poitou, Savoie, etc.).

La question était simple quand on connaissait un seul séro-type : le spirochète (leptospire à partir de 1918) de l'ictère hémorragique transmis par les rats, par l'eau ; la leptospirose ictéro-hémorragique fut déclarée maladie professionnelle. Puis la découverte d'autres leptospires donnant des maladies transmissibles à l'homme, leptospiroses des mines, des chiens, des porcs, présence de leptospires pathogènes dans l'eau, devrait entraîner la modification des règlements. Cette mise au point est souhaitée par tous ceux qui s'intéressent à la question et par les divers corps de métiers qui peuvent être atteints.

Actuellement, après tout ce qui a été appris sur les leptospires et les leptospiroses en quarante-cinq ans, on sait que toutes peuvent être considérées, par certains côtés, comme des maladies professionnelles, et cela à condition que l'on ne juge pas simplement par les signes cliniques, mais que le diagnostic soit établi par l'examen sérologique fait dans un laboratoire spécialisé et que toutes les causes d'erreurs dues à des contaminations secondaires soient éliminées. Et ce dernier détail n'est pas le moindre, puisque toutes les espèces animales sont sensibles à un ou plusieurs sérotypes de leptospires. L'homme et les animaux subissent la même règle. Cette multiplicité des vecteurs et des récepteurs explique la nécessité d'un séro-diagnostic précis. La baisse des coagglutinines doit être surveillée par des séro-diagnostics répétés (voir exemples dans le texte ci-dessus : les cas du groupe III).

C'est surtout à propos des contagions dans le domaine agricole que doivent être proposés les textes nécessaires. Récemment Desoille [21] en a eu l'occasion, à propos d'un cas de leptospirose à *L. ictero-hemorragiae* chez un porcher, affection qui n'entrant pas dans le cadre légal des maladies du travail, mais qui pouvait être un accident du travail dû soit au porc, lui-même vecteur du leptospirose, soit à des rats ou à des eaux de la porcherie. L'auteur et ses collaborateurs demandent que soit acceptée une définition de la maladie : syndrome fébrile, douloureux, quel que soit le leptospire causal, à condition que le diagnostic soit établi par un examen de laboratoire, en particulier par un séro-diagnostic.

Les travaux professionnels pourraient être de catégories diverses selon leur position dans le régime général ou dans le régime agricole. Dans le premier groupe se classeraient les travaux dans les égouts, les mines, les abattoirs, les écuries, les usines de délainage, le contact obligatoire avec un chien (gardien) ; les accidents de laboratoire subis par des travailleurs

en contact avec des animaux servant pour des expériences (rats, souris, etc.), les travaux d'aménagement de cours d'eau, des rizières, tous les travaux effectués dans les piscines (entretien, réfection) ; surveillance des eaux et des nageurs. Dans le second groupe devraient être compris tous les travaux agricoles où les sujets sont passibles de contamination par l'eau, pieds et mains mouillés et souillés : travaux dans les marais, fau cardage des étangs, curage des mares, culture des rizières, rouissement du chanvre et du lin, travail dans les laiteries, conserveries, porcheries, bergeries, écuries, vacheries, travaux et soins concernant le bétail, toutes occupations qui multiplient les causes de contagion puisque des eaux de lavage, des eaux souillées et des animaux vecteurs entrent en jeu en même temps. Ces mesures ne seraient qu'une mise au point pour les leptospiroses de ce qui a été fait pour les brucelloses.

#### RÉSUMÉ.

La leptospirose à *L. pomona* et à *L. mitis* J. d'origine porcine n'est pas rare en France ; elle est surtout localisée à l'Est : Bourgogne, Franche-Comté, Savoie, nord du Dauphiné, à l'Ouest : région nantaise, Vendée, Charentes ; mais on rencontre des cas isolés ou de petites épidémies environ sur les deux tiers du territoire français. Il s'agit en particulier des cas à *L. pomona* : 143 cas positifs de 1945 à 1960 décelés par l'Institut Pasteur de Paris. *L. mitis* J est moins fréquent. La répartition des foyers est superposable aux régions où l'infection des porcs et des chevaux est connue (carte). Sous l'angle économique et médico-légal, cette affection n'est pas négligeable, elle doit être classée parmi les maladies professionnelles. Du reste, toutes les leptospiroses peuvent être dans certaines circonstances reconnues comme maladie professionnelle, à condition que soit fait, pour chaque cas, un séro-diagnostic qui garantisse l'origine infectieuse. Des mesures sont nécessaires dans le régime agricole pour lequel rien de précis n'est prévu.

#### SUMMARY

HUMAN LEPTOSPIROSIS INDUCED BY *L. pomona* AND *L. mitis*  
JOHNSON 1942 (SCHWEINEHÜTERKRANKHEIT).

Human leptospirosis induced by *L. pomona* and *L. mitis* transmitted by swine, is not rare in France. It is mainly localized in the East (Bourgogne, Franche-Comté, Savoie, Northern Dauphiné) and in the West (Nantes, Vendée, Charentes) ; but isolated cases or small epidemics occur in about two thirds of France.

These cases are mainly caused by *L. pomona*: 143 isolations carried out by the Pasteur Institute from 1945 to 1960.

*L. mitis* is less frequent.

The foci are found in the regions where swine and horse infections occur (see map).

From the economic and forensic viewpoint, this infection is not negligible; it must be classified with the professional diseases. Besides, any case of leptospirosis may, in certain circumstances, be acknowledged as an occupational disease, on condition that a serodiagnosis proving the infectious origin be made in each case.

In the agricultural field, nothing is stated, and measures should be taken.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABDOUCHELI (T.). *Thèse*, Paris, 1952.
- [2] ANDRIEU (G.), MONNIER (J.) et RAYNAUD (C.). *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1952, **68**, 314.
- [3] AUSTONI (M.) et NICOLIN (A.). *Boll. Mem. Soc. Triveneta Med. int.*, 1953, **1**.
- [4] AUSTONI (M.) et ZENI (G.). *Giorn. Mal. inf.*, 1952, **4**, 347.
- [5] BABUDIERI (B.) et BIANCHI (L.). *Z. Immun. Forsch.*, 1940, **98**, 37.
- [6] BOCCA. *Soc. Méd. Hôp. Lyon*, novembre 1936.
- [7] BOQUIEN (Y.), HERVOUËT (D.), DAUPHIN et M<sup>lle</sup> VERDIER. *Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. Paris*, 1951, **67**, 88.
- [8] BOQUIEN (M.), KOLOCHINE-ERBER (B.), HERVOUËT (D.) et DUHAMEL. *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1950, **134**, 137.
- [9] BOUCHET (M.). *Relation sur la pseudo-typo-méningite des porcs*. Imprimerie Hérisson, Annecy, 1935.
- [10] BOULET (P.), SERRE (H.), PASSOUANT (P.), VALAT (G.), LATOUR (M.) et IZARN (P.). *Soc. méd. Biol., Montpellier et Languedoc méditerranéen*, 7 janvier 1949 ; in *Presse Méd.*, 1949, n° 29, 396.
- [11] BREDE (H. D.). *Z. Immun. Forsch.*, 1951, 109/1, 1.
- [12] BRION (A.) et BERTRAND (M.). *Concours méd.*, 1957, **75**, 4505.
- [13] CAYLA (J.). *Thèse*, Paris, 1939.
- [14] CHARLEUX (G.). *J. méd. Chir. prat.*, novembre 1933.
- [15] CHARLEUX (G.). *Lyon méd.*, 1938, **157**, 650 ; *Presse méd.*, 1937, n° 24, 346.
- [16] CLAYTON (G. E. B.), DERRICK (E. M.) et CILENTO (R.). *Med. J. Austr.*, 1937, **1**, 647.
- [17] COMBIESCUS (D.) et coll. *Leptospirozele*. Ed. Acad. Rep. pop. rom., 1957.
- [18] DEMOLE. *Rev. Med. Suisse Rom.*, 1934, 655.
- [19] DEPARIS (M.), SARRAZIN (A.), MANIGAND (G.), LEBORGNE (M.) et TISON (C.). *Sem. Hôp.*, 1960, 1025.
- [20] DERRICK (E. M.). *Med. J. Austr.*, 1942, **1**, 431.
- [21] DESOILLE (H.), MOLLARET (P.) et KOLOCHINE-ERBER (B.). *Arch. Mal. prof.*, 1959, **20**, 145.

- [22] DURAND (P.), GIROUD (P.), LARRIVE (F.) et MESTRALLET (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **204**, 830, 957 et 1032.
- [23] FRAGA DE AZEVEDO, FARO (J. E.), MONTEIRO (M. DA C.). *Ann. Inst. Med. trop.*, 1956, **43**, 557.
- [24] FRAGA DE AZEVEDO, FARO (J. E.), MONTEIRO (M. DA C.). *Rev. Iber. Parasit.*, Tomo extraordinario, Março, 1955.
- [25] FROIN. *Thèse*, Paris, 1937.
- [26] GASPARDIS (D.). *Thèse*, Ist. Igiene Univ. Padova, 1952.
- [27] GOIN (R.). *Thèse*, Paris, 1950.
- [28] GSELL (O.). *Schw. med. Wschr.*, 1946, **76**, 237.
- [29] GSELL (O.). *Presse méd.*, 1945, 525.
- [30] GSELL (O.). *Bull. Acad. Méd.*, 1946, **130**, 688.
- [31] GSELL (O.). *Bull. Schw. Akad. Med.*, 1944, **4**, 67.
- [32] GSELL (O.), REHSTEINER (K.) et VERREY (F.). *Ophthalmologica*, 1946, **112**, 320.
- [33] GSELL (O.). *Ergebn. inn. Med.*, 1949, 367.
- [34] GSELL (O.). *Arch. Path. comp.*, 1949, **49**, 407.
- [35] GSELL (O.) et WIESMANN (E.). *Schweiz. med. Wschr.*, 1948, **78**, 503.
- [36] JANBON (M.) et BERTRAND (A.). *Rev. Prat.*, 1959, **8**, 3365.
- [37] JOHNSON (D. W.). *Med. J. Austr.*, 1942, **29**, 431.
- [38] KEMENES (F.). *Acta vet. Acad. Sci. Hung.*, 1958, **8**, 43.
- [39] KMETY (E.), PLESKO (P.) et CHYTO (P.). *Zbl. Bakt.*, I. Orig., 1956, **167**, 243.
- [40] KOLOCHINE-ERBER (B.). *Rev. Prat.*, 1958, **11**, 3381.
- [41] KOLOCHINE-ERBER (B.) et MAILLOUX (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 359-375.
- [42] LAVABRE (P.). *Thèse*, Lyon, 1937.
- [43] LEDOUX (M. E.). *Bull. Acad. Méd.*, 1938, **120**, 417-421.
- [44] LEDOUX (M. E.). *Rev. Hyg.*, 1939, **61**, 252.
- [45] LEGER, DAVID CHAUSSÉ et AUBIN. *J. Méd. Bordeaux*, 1952, 378.
- [46] MATTEI (C.), KOLOCHINE-ERBER (B.), AVIERINOS (F.), RECORDIER (A. M.), PAYAN (M.) et BARBE (A.). *Presse méd.*, 1950, **58**, 1269.
- [47] MICHAUD (R.) et ROCH (R.). *Rev. Méd. Suisse Rom.*, 1951, **71**, 786.
- [48] MOCHTAR (A.) et COLLIER (W. A.). *Med. ind. Bl. Diergeneesk*, 1939, **51**, 339.
- [49] MULLER (A.). *Schw. med. Wschr.*, septembre 1932, **13**.
- [50] PARNAS (J.) et DOMBROWSKI (T.). *Arch. Inst. Pasteur*, Tunis, 1957, **34**, 351-.
- [51] PENSO (G.). *Arch. Soc. Med. Colon.*, 1936, **17**, 65.
- [52] PENSO (G.). *Mouvement sanit.*, 1936, **13**, 508.
- [53] PENSO (G.). *Rev. Hyg.*, 1938, n° 7.
- [54] PENSO (G.) et ROSA (B.). *R. C. Ist. Sanità pub.*, **1**, 77.
- [55] PLANCHU (M.) et VIALLIER (J.). *Lyon med.*, 1950, n° 3, 33.
- [56] RAYMOND (C.). *Progrès méd.*, septembre 1936.
- [57] REYSZ (R.). *Thèse*, Strasbourg, 1940.
- [58] ROCH (M.). *Rev. path. comp.*, 1945, **49**, 417.
- [59] ROCH (M.), DEMOLE (J. M.) et MACH (R. S.). *Bull. Mém. Soc. Hôp. Paris*, 1935, **51**, 1271.
- [60] ROCH (M.) et PENSO (G.). *Schweiz. med. Wschr.*, 1933, n° 63, 44.
- [61] ROCH (M.) et MARCH (R. S.). *Praxis Schweiz. med. Rdsch.*, 1947, 1.

- [62] SAVINO (E.) et RENNEILA (E.). *Leptospira y leptospirosis en la República Argentina*. Buenos-Aires, Tomae Palumbo, 1944.
- [63] SCHMID (G.) et GIOVANELLA (R.). *Schw. Arch. Tierheilk.*, 1947, **89**.
- [64] SCHWEITZER (F.). *Wien. med. Wschr.*, 1952, **102**, 522.
- [65] SCLAFFER (P.). *Ouest méd.*, 1951, n° 8, 235.
- [66] SIGUIER (P.) et POULET (J.). *Bull. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1947, **63**, 707 ; *Paris méd.*, 1948, **38**, 373.
- [67] TOPCIU (V.) et DUMA (G.). *Timisoara med.*, 1956, 372.
- [68] URECH (E.). *Congrès franç. Méd.*, Paris, 1936, 44 et 60.
- [69] URECH (E.), BACH (D.) et RIVIER (J.). *Praxis*, 1950, **39**, 1007.
- [70] WACKER (F.). *Thèse*, Genève, 1936.
- [71] ZOLLIKOFER (M.). *Schweiz. med. Wschr.*, 1955, **85**, 1088.

---

# ÉTUDE DE L'ACTION ANTIBACTÉRIENNE DU SULFAMIDE

par A. LAMENSANS et A. FARI (\*).

(Institut Pasteur, Service de Chimie Thérapeutique B)

Au cours de nos travaux sur les rapports entre les antibiotiques et l'immunité, nous avions effectué des enregistrements continus de la croissance de germes soumis à l'action des antibiotiques, et nous avions remarqué incidemment des anomalies dans la forme de la courbe de croissance d'*E. coli* en présence de p-amino-phénylsulfamide [1162 F (1)]. Cette observation nous a conduits à examiner de près ce phénomène, puis à étudier l'action antibactérienne du SA en général. Certains des résultats exposés ci-dessous ont été résumés dans une notre préliminaire [1].

Le présent travail, et le suivant, se rapportent à l'ensemble des phénomènes observés au cours de nos recherches.

## TECHNIQUES GÉNÉRALES.

### Souches utilisées.

Les différentes souches d'*E. coli* utilisées sont les suivantes : souche ML 30, inducible pour la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -galactoside-perméase [2], ainsi que pour la  $\beta$ -glucuronidase et la  $\beta$ -glucuronide-perméase [3, 4] ; souche ML 308,  $\beta$ -galactosidase constitutive ; souche ML 3, mutant « cryptique » inducible dans certaines conditions pour la  $\beta$ -galactosidase [2] ; souche ML 30-AL, mutant  $\beta$ -glucuronidase constitutif.

### Milieux de culture.

MILIEU 63 :

Phosphate monopotassique .....	13,6	g
Sulfate d'ammonium .....	2	g
Sulfate de magnésium .....	0,1	g
Sulfate de fer .....	0,0005	g
Eau bidistillée .....	Q. S.	pour 1 litre

pH ramené à 7,2 à l'aide de lessive de potasse.

Stérilisation à l'autoclave (vingt minutes à 120° C).

(\*) Manuscrit reçu le 19 septembre 1960.

(1) Abréviations utilisées dans ce travail : SA = p-aminophénylsulfamide ; PAB = acide p-aminobenzoïque.

## MILIEU 70 :

Tris (hydroxyméthyl) aminométhane .....	M/10
Chlorure d'ammonium .....	M/50
Sulfate de magnésium, 7H <sub>2</sub> O .....	M/1 000
Perchlorure de fer .....	M/100 000
Chlorure de potassium .....	M/1 000
Eau bidistillée .....	Q. S.

pH ramené à 7,5 à l'aide d'acide chlorhydrique.

Stérilisation à l'autoclave (vingt minutes à 120° C).

## MILIEU 61 :

Acide citrique .....	10,5	g
Chlorure d'ammonium .....	2	g
Chlorure de magnésium .....	0,2	g
Perchlorure de fer .....	0,0005	g
Phosphate monopotassique .....	0,68	g
Sulfate d'ammonium .....	0,010	g
Eau bidistillée .....	Q. S.	pour 1 litre

pH ramené à 7 à l'aide de lessive de potasse.

Stérilisation à l'autoclave (vingt minutes à 120° C).

*Croissance bactérienne.*

Toutes les cultures sont effectuées dans des fioles coniques, agitées dans un bain-marie à 37° C ; la source de carbone et d'énergie choisie (à raison de 3 g par litre) est ajoutée extemporanément au milieu de culture.

La croissance des cultures est suivie par mesure de la densité optique au moyen de l'électrophotomètre de Meunier, à 600 m $\mu$  ; pour les observations de la croissance en continu, les courbes sont enregistrées sur le biophotomètre de Bonét-Maury et Jouan.

*Numération des germes.*

Le nombre des bactéries viables est déterminé après dilution convenable des prélèvements dans l'eau physiologique stérile, de manière à obtenir des suspensions contenant de 100 à 300 germes/ml. A l'aide de ces suspensions, on ensemence des boîtes de Petri contenant de la gélose ordinaire. La numération des colonies est effectuée après incubation des boîtes pendant dix-huit heures à 37° C.

*Mesure des activités enzymatiques.*

a)  $\beta$ -galactosidase : la méthode utilisée est celle décrite par Monod et coll. [5].

b)  $\beta$ -glucuronidase : la méthode utilisée est celle décrite par Stoeber [3].

c) Phosphatase alcaline : l'induction de la phosphatase alcaline et la détermination de l'activité de cette enzyme sont effectuées

selon les techniques décrites par Torriani [6] et modifiées par Naono et Gros [7].

Dans tous les cas, les activités enzymatiques sont déterminées sur des prélèvements bactériens additionnés d'une goutte de toluène (et éventuellement de désoxycholate de sodium à 1 p. 100) et soumis à une agitation mécanique énergique pendant trente minutes à 37° C.

#### *Mesure de la respiration.*

La respiration des bactéries est déterminée selon la technique directe de Warburg. Température : 37° C. Volume de la culture : 2 ml. Puits central : 0,1 ml de KOH à 30 p. 100.

#### *Expériences de radio-activité.*

1<sup>o</sup> Le sulfate  $^{35}\text{S}$  (sans entraîneur) provient du Commissariat à l'Energie Atomique.

L'incorporation du  $^{35}\text{S}$  dans les protéines bactériennes est déterminée comme suit : à partir des suspensions de germes à étudier, des prélèvements sont effectués à des temps appropriés et additionnés d'un volume égal d'acide trichloracétique froid à 10 p. 100. Le mélange est maintenu pendant trente minutes au froid, puis filtré sur des filtres Millipore [8]. Ceux-ci sont lavés deux fois avec de l'acide trichloracétique froid à 5 p. 100, puis placés sur des plaques d'aluminium, séchés et passés au compteur.

2<sup>o</sup> Le *p*-aminophénylsulfamide- $^{35}\text{S}$  a été aimablement synthétisé par le Dr L. Pichat, du Commissariat à l'Energie Atomique. L'incorporation du SA- $^{35}\text{S}$  dans les protéines et dans les acides nucléiques bactériens est déterminée comme suit : à partir des suspensions de germes à étudier, des prélèvements sont effectués à des temps appropriés et additionnés d'un volume égal d'acide trichloracétique froid à 10 p. 100 ; le mélange est séparé en deux fractions : l'une d'elles est maintenue au froid pendant trente minutes, puis filtrée sur des filtres Millipore ; l'autre est portée pendant trente minutes au bain-marie bouillant, puis filtrée sur des filtres Millipore. Dans les deux cas, les filtres sont lavés avec de l'acide trichloracétique à 5 p. 100, puis placés sur des plaques d'aluminium, séchés et passés au compteur.

### RÉSULTATS.

#### I. — *Forme de la courbe de croissance d'*E. coli* en présence de SA.*

Après addition de SA à une culture d'*E. coli* en voie de croissance exponentielle, la croissance devient linéaire, c'est-à-dire, que la densité optique de la culture suit une progression arithmétique.

tique en fonction du temps (fig. 1). Après un certain temps, et pour des concentrations suffisantes de SA, la croissance s'arrête complètement.

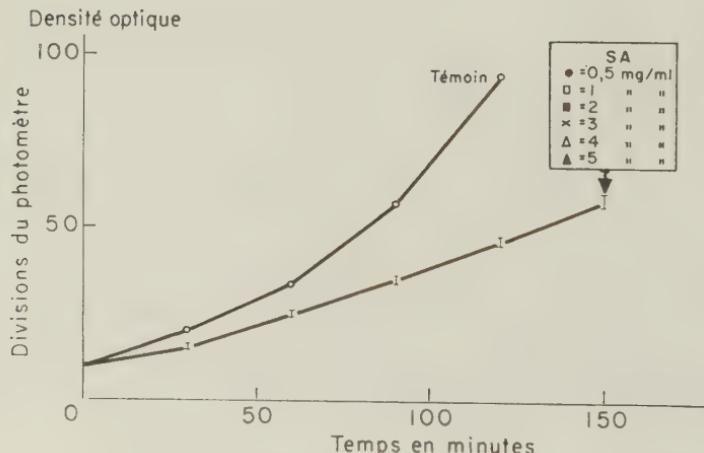
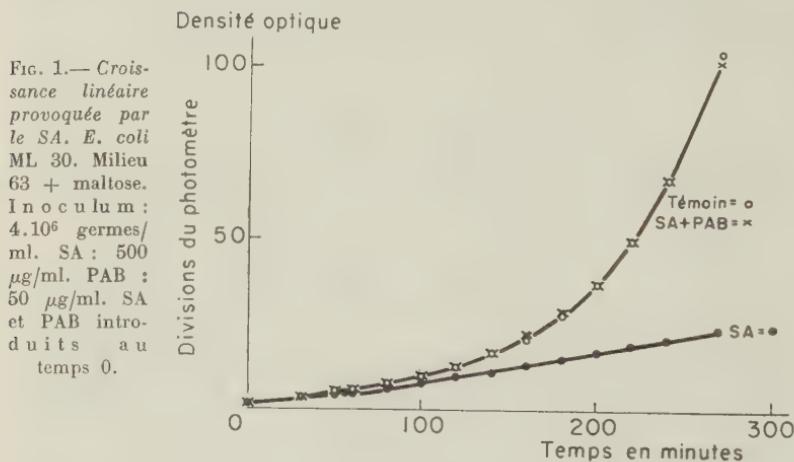


FIG. 2. — *Croissance linéaire en présence de différentes concentrations de SA. E. coli ML 3. Milieu 63 + maltose. Inoculum :  $5 \cdot 10^6$  germes/ml. SA introduit au temps 0.*

A. *Influence de la concentration de SA.* — La pente de la droite représentant la croissance des germes soumis à l'action du SA est indépendante de la concentration de SA : avec une même den-

sité bactérienne au départ, on obtient pratiquement la même droite avec des concentrations de SA variant de 0,5 à 5 mg/ml (fig. 2).

B. *Influence de l'importance de l'inoculum* (2). — Il est bien connu que l'action antibactérienne des sulfamides est liée à l'importance de l'inoculum. Nous avons été amenés, selon les expériences et le but envisagés, à utiliser au cours de notre travail de petits inocula avec des concentrations faibles de SA, ou, au contraire, des inocula importants avec des concentrations plus élevées de SA. Ainsi, les densités des populations bactériennes au départ ont été comprises entre  $4 \cdot 10^2$  et  $6 \cdot 10^7$  germes/ml, et les concentrations de SA ont varié de  $1 \cdot 10^{-6}$ M à  $4 \cdot 10^{-2}$ M.

Mais, chaque fois que cela était nécessaire, nous avons vérifié

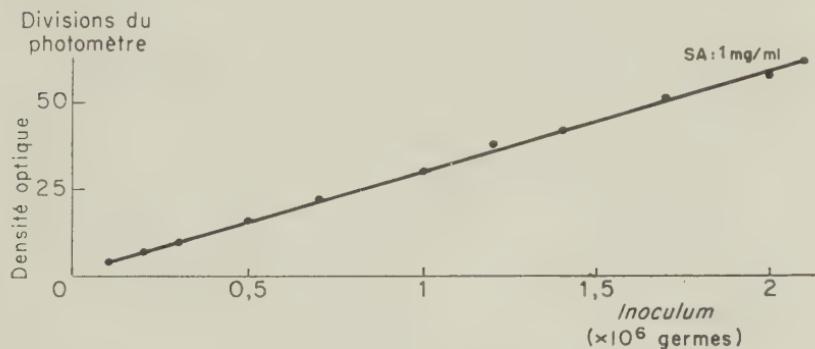


FIG. 3. — Quantité de matière bactérienne synthétisée en présence de SA.  
*E. coli* ML 30. Milieu 63 + maltose. SA introduit au départ. Inoculum variant de  $0,1 \cdot 10^6$  à  $2 \cdot 10^6$  germes. Lectures effectuées sur cultures agitées de dix-huit heures à 37° C.

qu'un phénomène observé avec un inoculum déterminé et une concentration donnée de SA pouvait être reproduit en augmentant ou en diminuant simultanément ces deux facteurs.

## II. — Quantité de matière bactérienne synthétisée en présence de SA.

Nous avons déterminé la quantité de masse bactérienne élaborée en présence d'une même concentration de SA par des cultures présentant au départ des densités bactériennes croissantes, celles-ci variant dans des limites très larges. En présence de SA, et quel

(2) Par inoculum, nous désignons la concentration en germes au départ de l'expérience, étant bien entendu qu'il s'agit toujours de bactéries prélevées en phase exponentielle de la croissance.

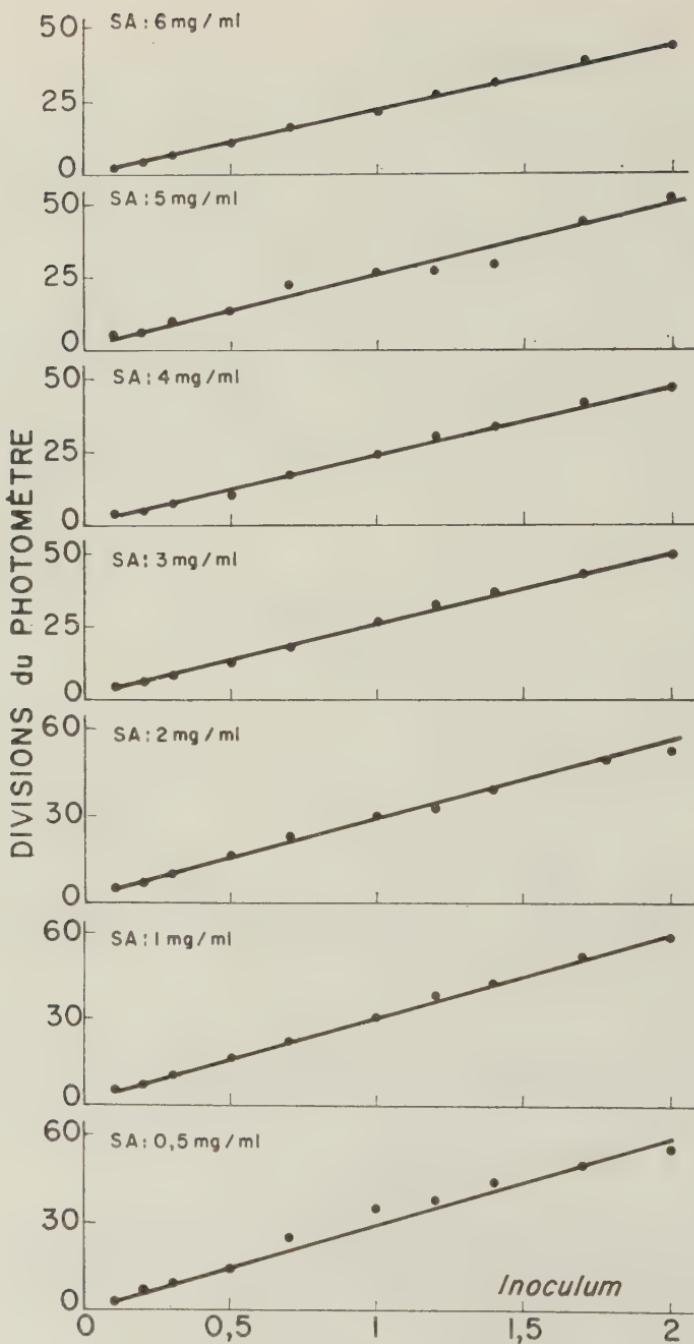


FIG. 4. — Quantité de matière bactérienne synthétisée en présence de différentes concentrations de SA.  
*E. coli* ML 30. Milieu 63 + maltose. SA introduit au départ. Concentrations de SA variant de 0,5 à 0,6 mg/ml. Inoculum variant de  $0,1 \cdot 10^6$  à  $2 \cdot 10^6$  germes. Lectures effectuées sur cultures agitées de dix-huit heures à 37°C.

que soit le nombre de germes présents au départ, le rapport densité optique initiale/densité optique finale est constant (fig. 3) ; la valeur de ce rapport varie de 25 à 30.

En outre, la concentration de SA n'influe pas sur l'accroissement de la masse bactérienne effectué en sa présence (fig. 4).

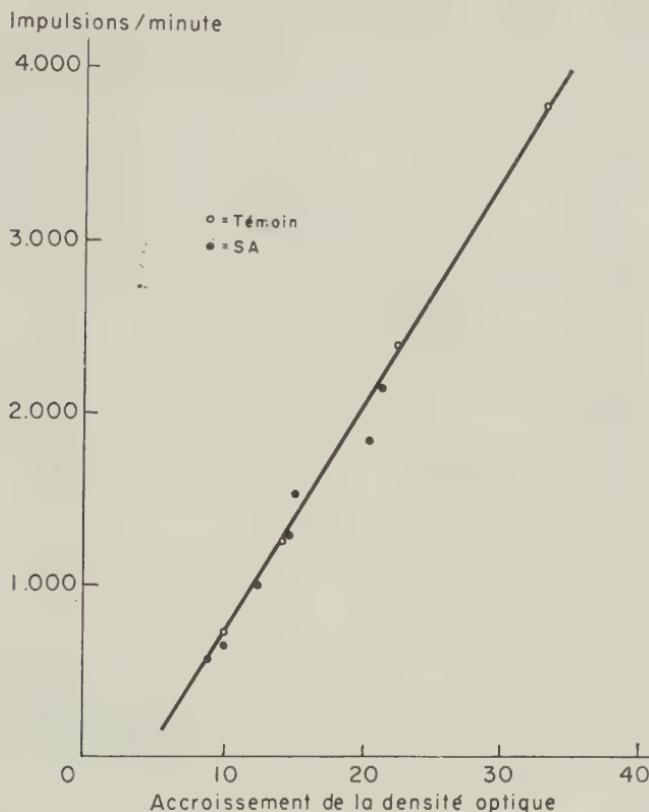


FIG. 5. — Action du SA sur l'incorporation de  $^{35}\text{S}$ .

*E. coli* ML 30, Milieu 63 + 6. Inoculum :  $4.10^6$  germes/ml. SA : 1 mg/ml. Introduction de SA et de  $^{35}\text{S}$  au départ.

Ainsi, la croissance linéaire d'*E. coli* en présence de SA s'arrête lorsque la masse bactérienne s'est accrue de vingt-cinq à trente fois, c'est-à-dire d'une quantité de matière vivante correspondant à l'accroissement observé après quatre à cinq divisions d'un germe normal, cultivé en absence de SA.

### III. — Action du SA sur l'incorporation de $^{35}\text{S}$ dans les protéines bactériennes.

Les expériences effectuées à l'aide de  $^{35}\text{S}$ , fourni aux bactéries sous forme de sulfate marqué, montrent que la radio-activité spécifique des germes est identique dans la culture-témoin et dans celle contenant du SA (fig. 5).

Le SA n'empêche donc pas la synthèse des protéines. L'augmentation de la masse bactérienne en présence de SA est liée à une augmentation corrélative de la quantité de protéines.

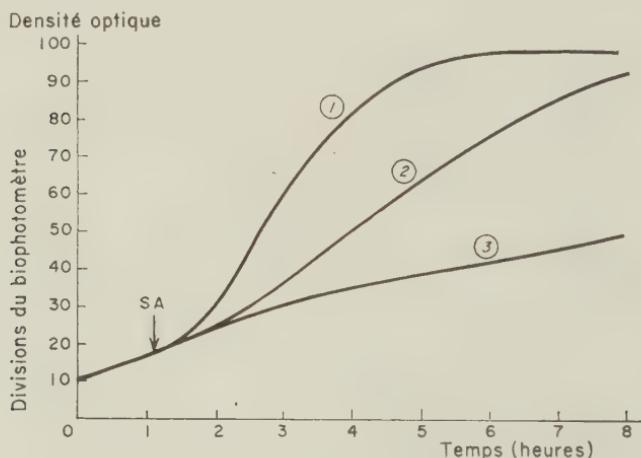


FIG. 6. — Début de l'action du SA. (Reproduction d'une bande d'enregistrement du biophotomètre.)

*E. coli* ML 30. Milieu 63 + glucose. Inoculum :  $6 \cdot 10^6$  germes/ml. SA : 2 mg/ml. PAB : 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . PAB introduit au temps 0. SA introduit au temps indiqué par la flèche. 1 : Témoin. 2 : SA + PAB. 3 : SA.

### IV. — Nombre de germes viables obtenus en présence de SA.

Il était important de déterminer la relation entre la densité optique des cultures soumises à l'action du SA et le nombre de germes viables présents dans ces cultures.

Les numérations effectuées montrent que, à partir de l'addition de SA, les bactéries demeurent un certain temps (vingt à trente minutes) sans se multiplier, mais elles augmentent de taille. Puis, le nombre de germes viables augmente, mais d'une manière linéaire par rapport au temps, les dimensions des bactéries (évaluées d'après le rapport densité optique des cultures/nombre de germes) demeurant supérieures à celles des germes normaux.

V. — *Début de l'action du SA.*

En utilisant la technique des enregistrements continus déjà mise à profit pour l'étude d'associations d'antibiotiques [9, 10], nous avons observé que l'introduction de SA dans des cultures d'*E. coli* en voie de croissance exponentielle provoque *immédiatement* un ralentissement de la croissance de germes (fig. 6).

L'action immédiate du SA a été, du reste, confirmée d'une manière irréfutable par les mesures d'activités enzymatiques et

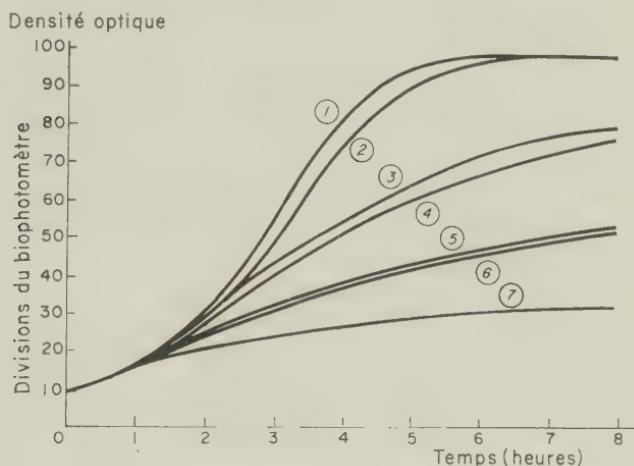


FIG. 7. — *Antagonisme de l'action anti-bactérienne du SA.* (Reproduction d'une bande d'enregistrement du biophotomètre.)

*E. coli* ML 30. Milieu 63 + glucose. Inoculum :  $4 \cdot 10^6$  germes/ml. Toutes substances, y compris le SA (1 mg/ml), introduites au temps 0. 1, témoin. 2, SA + PAB (100 µg/ml). 3, SA + acides aminés (glycine, méthionine, sérine, thréonine :  $5 \cdot 10^{-4}$ M). 4, SA + vitamine B<sub>12</sub> (1 µg/ml). 5, SA + acide folique (150 µg/ml). 6, SA. 7, SA + adénine ( $1 \cdot 10^{-5}$ M) + thymine ( $5 \cdot 10^{-4}$ M).

de la respiration de bactéries soumises à l'action du SA, ainsi qu'on le verra plus loin. Dans tous les cas, les effets de l'addition du SA peuvent être observés instantanément.

VI. — *Substances antagonisant l'action anti-bactérienne du SA.*

En utilisant la même technique des enregistrements continus, nous avons entrepris une étude approfondie des substances chimiquement définies susceptibles d'antagoniser l'action anti-bactérienne exercée par le SA sur *E. coli*, notamment : des acides

aminés, des bases puriques ou pyrimidiques, l'acide folique et ses dérivés, des vitamines et divers autres corps.

De cette étude, dont les résultats paraîtront ultérieurement, il nous paraît utile d'extraire les points suivants (fig. 7) :

- a) Le PAB antagonise régulièrement l'action du SA.
- b) Le mélange : glycine + méthionine + sérine + thréonine, antagonise nettement l'action du SA, mais d'une manière moins marquée que le PAB.
- c) Il en est de même de la vitamine B<sub>12</sub>.
- d) L'adénine, la guanine et la thymine, seules ou associées entre elles, n'exercent aucune action antagoniste sur l'activité antibactérienne du SA ; bien au contraire, dans certains cas, il a pu être observé une augmentation de l'action anti-bactérienne du SA.
- e) Enfin, l'acide folique ne modifie pas l'action du SA sur *E. coli*.

Certains de ces faits ont déjà été signalés [11, 12], mais nous avons voulu les retrouver dans nos conditions expérimentales.

Les effets observés après addition de SA à une culture d'*E. coli* en voie de croissance exponentielle, notamment la transformation de cette croissance en croissance linéaire et l'absence d'inhibition de la synthèse globale des protéines, laissaient à penser que le SA pouvait agir sur les propriétés fonctionnelles des protéines bactériennes synthétisées en sa présence. En effet, « la linéarité de la croissance suggère qu'un ou plusieurs enzymes ne sont pas synthétisés sous une forme active » (G. N. Cohen [13]).

Nous avons été ainsi amenés à étudier l'action exercée, entre autres, par le SA sur les activités enzymatiques et la respiration d'*E. coli*.

Les résultats de cette étude font l'objet du travail suivant.

(La discussion des résultats, le résumé et la bibliographie se trouvent à la fin du travail suivant.)

# **ACTION DU SULFAMIDE SUR LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES BACTÉRIENNES**

par A. FARI et A. LAMENSANS (\*).

(Institut Pasteur, Service de Chimie Thérapeutique B)

Dans un travail précédent [14], nous avons décrit les effets observés après addition de *p*-aminophénylsulfamide (SA) à une culture d'*E. coli* en voie de croissance exponentielle ; les expériences décrites ici montrent que le SA interfère avec le métabolisme protéique des bactéries.

Les techniques générales utilisées ont été indiquées précédemment [14].

## RÉSULTATS.

### I. — Action du SA sur les activités enzymatiques d'*E. coli*.

**A. ENZYMES INDUITES.** — 1<sup>o</sup>  $\beta$ -galactosidase. — On sait que l'addition de  $\beta$ -thiométhylgalactoside (TMG) ou de  $\beta$ -isopropylthiogalactoside (IPTG) à une culture d'*E. coli* ML 30 en voie de croissance exponentielle induit immédiatement la synthèse de  $\beta$ -galactosidase [2]. En présence de SA, les bactéries demeurent un certain temps sans apparition de l'activité  $\beta$ -galactosidasique ; par la suite, cette activité apparaît, mais le taux différentiel de synthèse de l'enzyme (1), sous sa forme active est très inférieur à celui observé dans la culture-témoin.

Ce phénomène peut être reproduit dans des conditions expérimentales différentes [induction, concentration de germes et de SA] (fig. 1).

2<sup>o</sup>  $\beta$ -glucuronidase et phosphatase alcaline. — Les conditions particulières d'induction de ces deux enzymes, et notamment la nécessité d'une concentration très élevée de germes au départ, ne nous ont pas permis d'effectuer l'étude cinétique de l'action

(\*) Manuscrit reçu le 19 septembre 1960.

(1) Le taux différentiel de synthèse d'un constituant cellulaire déterminé, défini par Monod et coll. [15], est le rapport de la quantité de ce constituant synthétisée à la quantité de substance vivante formée dans le même temps.

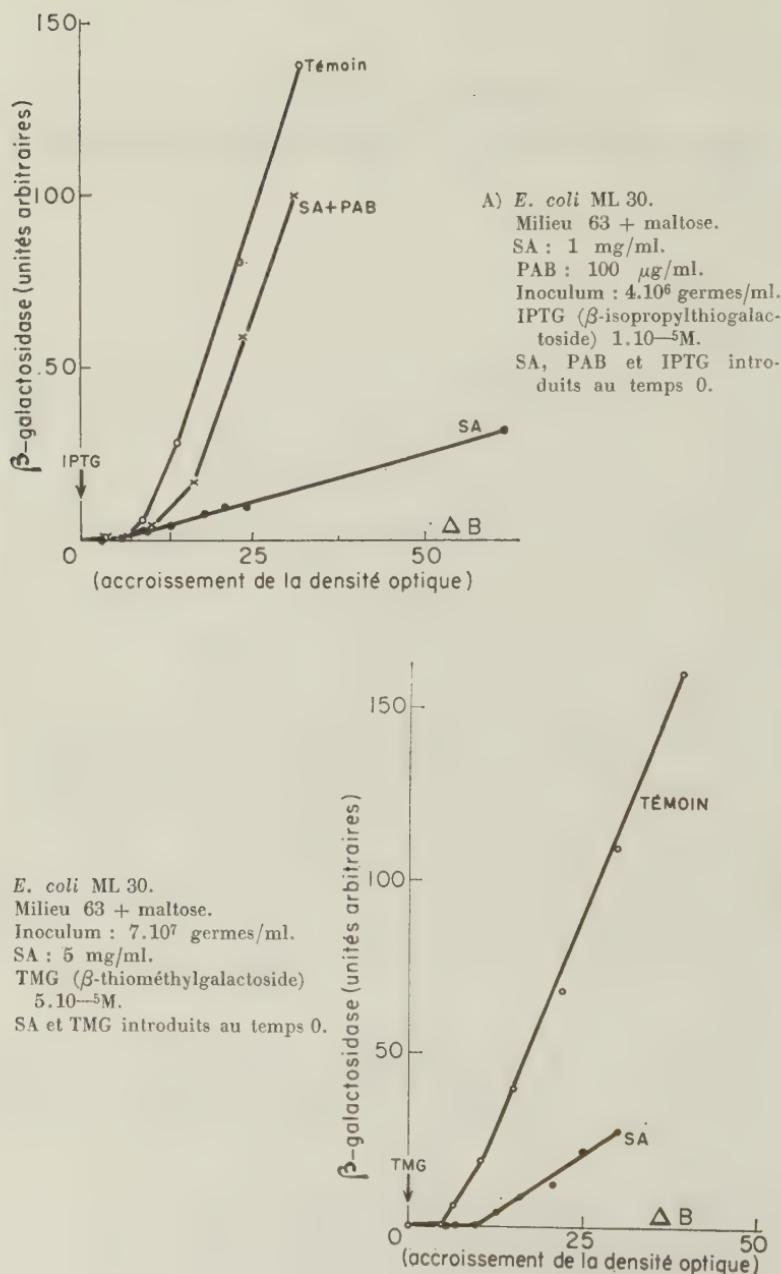


FIG. 1. — Action du SA sur la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase induite.

du SA sur ces synthèses induites. Néanmoins, le dosage des activités enzymatiques réalisé sur deux échantillons contenant un même nombre de bactéries soumises ou non à l'action du SA a montré que, en présence de ce dernier, les taux différentiels de synthèse de ces enzymes, sous leur forme active, sont très inférieurs à ceux observés dans les cultures témoins.

B. ENZYMES CONSTITUTIVES. — 1°  $\beta$ -galactosidase. — L'addition de SA à une culture en voie de croissance exponentielle de la

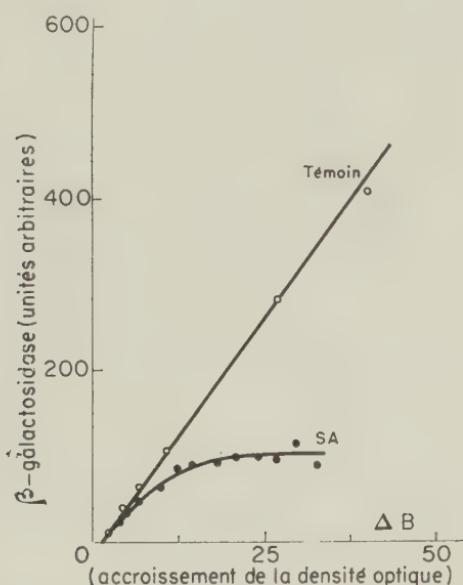


FIG. 2. — Action du SA sur la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase constitutive.  
*E. coli* ML 308. Milieu 63 + maltose. Inoculum :  $4 \cdot 10^6$  germes/ml. SA : 1 mg/ml.  
SA introduit au temps 0.

souche ML 308 d'*E. coli* entraîne une diminution progressive du taux différentiel de synthèse de la  $\beta$ -galactosidase active (fig. 2).

2°  $\beta$ -glucuronidase. — Le même phénomène peut être observé dans le cas de la  $\beta$ -glucuronidase (fig. 3) chez la souche ML 30-AL.

## II. — Action du SA sur l'adaptabilité d'*E. coli* à divers sucres.

La figure 4 montre l'action du SA sur l'adaptation d'*E. coli* au lactose chez des bactéries précultivées en présence de glucose, épousées par agitation sans source de carbone, puis introduites

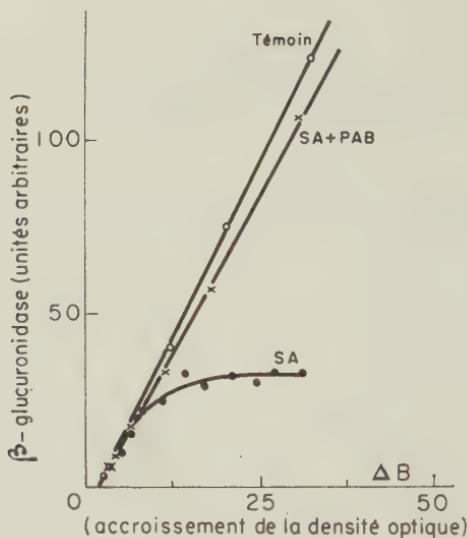


FIG. 3. — Action du SA sur la synthèse de la  $\beta$ -glucuronidase constitutive.  
*E. coli* ML 30 AL. Milieu 63 + maltose. SA : 1 mg/ml. PAB : 100  $\mu$ g/ml. SA et PAB introduits au temps 0.

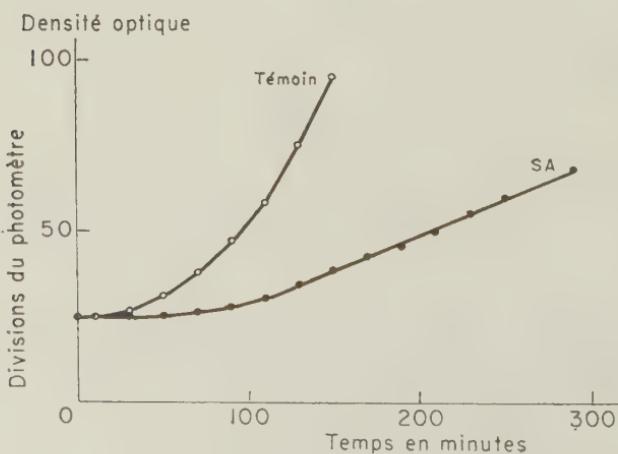


FIG. 4. — Action du SA sur l'adaptation d'*E. coli* au lactose.  
*E. coli* ML 30. Les bactéries sont pré-cultivées sur milieu 63 + glucose, épuisées par agitation sans source de carbone, puis introduites en milieu 63 + lactose, contenant ou non du SA (5 mg/ml).

en milieu minéral additionné de lactose. Dans la culture-témoin, on observe normalement un temps de latence, puis la croissance devient exponentielle. En présence de SA, la phase de latence est prolongée ; par la suite, la croissance apparaît, mais elle est linéaire.

Un phénomène similaire est observé dans le cas de l'adaptation d'*E. coli* au maltose.

### III. — Action du SA sur la respiration d'*E. coli*.

Dès l'addition de SA à une culture d'*E. coli* en voie de croissance exponentielle, la consommation d'oxygène devient linéaire (fig. 5). Ce fait indique que, parmi les protéines synthétisées en

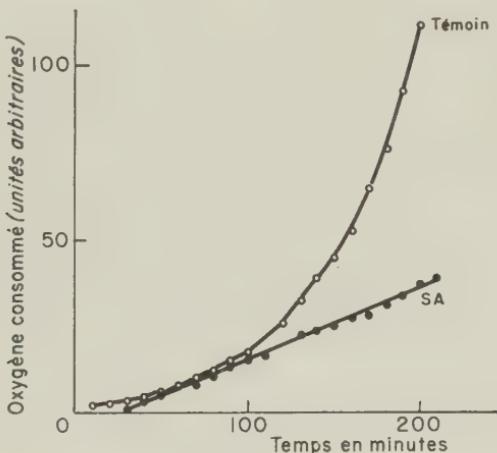


FIG. 5. — Action du SA sur la respiration d'*E. coli*.

*E. coli* ML 30. Milieu 63 + glucose + asparagine ( $5 \cdot 10^{-4}$ M) + acide glutamique ( $5 \cdot 10^{-4}$ M) [16]. SA : 2 mg/ml. Inoculum :  $2 \cdot 10^7$  germes/ml.

présence de SA et présentant des propriétés fonctionnelles modifiées, se trouvent une ou plusieurs enzymes du système respiratoire.

### IV. — Caractères de l'action du SA.

a) Les travaux précédents ont porté sur *E. coli*, mais, au cours d'essais préliminaires, nous avons retrouvé les phénomènes de la croissance et de la respiration linéaires avec le staphylocoque.

b) Nous avons pu vérifier que les effets observés après addition de SA sont antagonisés par le PAB.

c) Les mêmes effets ont pu être reproduits avec des sulfamides substitués : sulfathiazole, sulfadiazine, sulfafurazole, sulfaméthoxypyridazine. La figure 6 en donne un exemple.

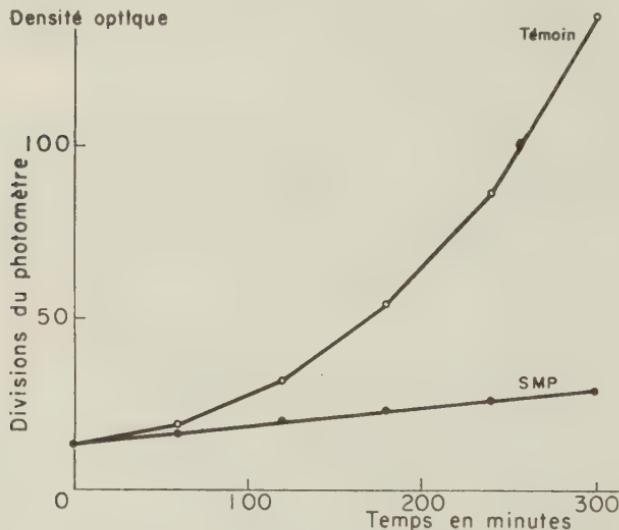


FIG. 6. — Croissance linéaire provoquée par la sulfaméthoxypyridine (SMP). *E. coli* ML 30. Milieu 63 + maltose. Inoculum :  $2.5 \cdot 10^7$  germes/ml. SMP : 3 mg/ml. SMP introduite au temps 0.

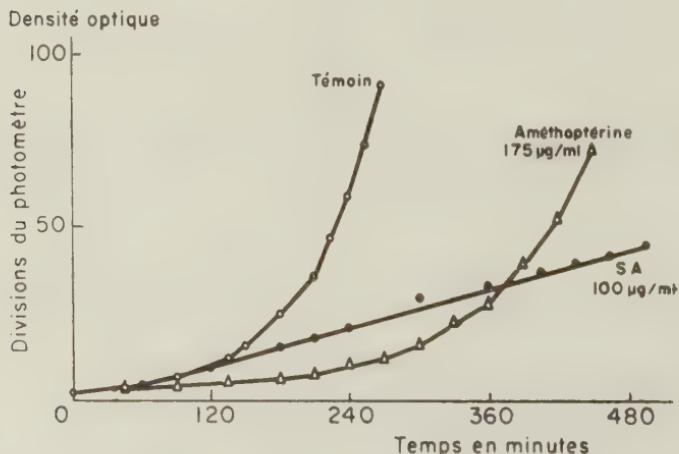


FIG. 7. — Croissance d'*E. coli* en présence d'améthoptérine. *E. coli* ML 30. Milieu 63 + glucose. Inoculum :  $4 \cdot 10^6$  germes/ml. SA et améthoptérine introduits au temps 0.

d) L'améthoptérine utilisée à des concentrations sub-bactériostatiques permet une croissance d'*E. coli* ralentie mais dont l'allure reste exponentielle (fig. 7); de même la respiration d'*E. coli* en présence d'améthoptérine conserve une allure exponentielle. De plus, le taux différentiel de la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase constitutive active élaborée en présence de cet antiméta-

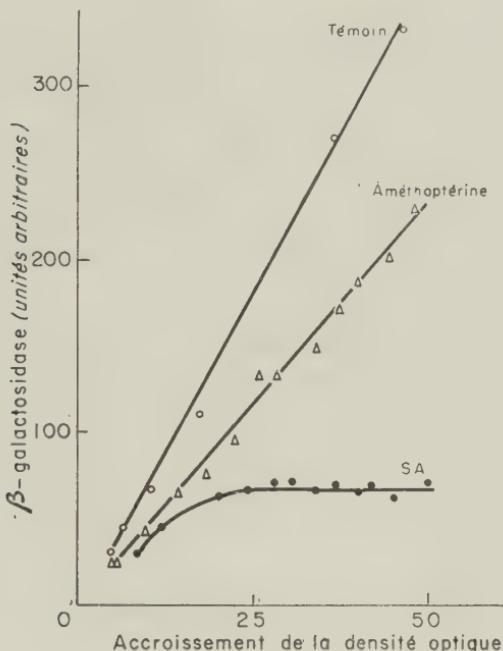


FIG. 8. — Action de l'améthoptérine sur la synthèse de  $\beta$ -galactosidase constitutive. *E. coli* ML 308. Milieu 63 + glucose. Inoculum :  $4 \cdot 10^6$  germes/ml. SA et améthoptérine introduits au temps 0.

bolite est, comme dans la culture-témoin, représenté par une droite (fig. 8). L'améthoptérine n'entraîne donc pas une modification de l'activité des protéines élaborées en sa présence.

#### DISCUSSION.

Trois faits essentiels ressortent de l'ensemble des résultats présentés plus haut.

1° En présence de SA, *E. coli* peut élaborer une quantité limitée de constituants cellulaires. Cette quantité, qui représente environ

vingt-cinq à trente fois la densité de départ, correspond à l'équivalent de 4 à 5 divisions bactériennes normales.

Déjà en 1941, Lwoff et coll. [17, 18] avaient observé que le SA permettait un accroissement limité de la densité optique des micro-organismes soumis à son action (2 à 3 divisions pour le flagellé *Polytomella caeca*, 3 à 4 divisions pour *E. coli* et *Proteus vulgaris*).

Ce fait explique pourquoi, avec des ensemencements abondants, l'action du SA peut paraître nulle si l'on se limite à la détermination de la densité bactérienne à la fin de l'expérience. « Le sulfamide manifeste son action quelle que soit la quantité de bactéries ensemencées... La vitesse de multiplication après ensemencement large d'*E. coli* et *Proteus vulgaris* est toujours sensiblement réduite » (Lwoff, Nitti et M<sup>me</sup> J. Tréfouël [18]).

2<sup>o</sup> *Le SA agit dès son addition à des cultures en voie de croissance exponentielle.* L'étude de la densité optique et les activités enzymatiques des cultures ne peuvent laisser à ce sujet aucun doute.

Ce fait semble en contradiction avec la notion classique selon laquelle un nombre minimum de divisions microbiennes en présence de SA est nécessaire pour que celui-ci agisse. En réalité, la mise en évidence de façon extrêmement précise d'un fait tel que l'action immédiate du SA exige l'utilisation de techniques et de conditions expérimentales appropriées, notamment :

a) l'emploi de milieux de culture permettant une croissance bactérienne rapide ;

b) l'expérimentation sur des cultures ne comportant pas de phase de latence (germes prélevés en phase exponentielle de croissance, donc en état physiologique favorable) ;

c) les résultats peuvent différer selon le phénomène choisi pour étudier la rapidité d'action du SA. A titre d'exemple, signalons que, dans certaines de nos expériences comportant des inocula importants, l'action du SA sur la densité optique des cultures n'était décelable qu'après trente ou même quarante-cinq minutes. Mais les dosages de la  $\beta$ -galactosidase active induite ou de la respiration bactérienne effectués lors de ces mêmes expériences révélaient, dès la dixième minute, une modification des propriétés biochimiques d'*E. coli*.

Enfin, il convient de noter l'imprécision de l'expression « délai d'action », certains auteurs ayant désigné par ce terme le moment où l'action du SA *commence* à être observable, et d'autres, le moment où cette action *est complète*. En fait, le SA agit immédiatement après son addition dans des cultures bactériennes ; la croissance des germes est ralentie et ne s'arrête qu'après un certain temps pendant lequel est élaborée une quantité de matière

bactérienne correspondant à celle obtenue après 4 à 5 divisions normales.

3<sup>e</sup> La possibilité de *synthèse de protéines anormales* sous l'action du SA nous semble particulièrement intéressante. Nous avons vu [14] que la radio-activité spécifique de germes cultivés en présence de sulfate-<sup>35</sup>S est identique dans la culture-témoin et dans celle contenant du SA.

Les résultats des études cinétiques effectuées sur diverses enzymes peuvent donc signifier, soit que le SA inhibe la synthèse nette de certaines protéines spécifiques, soit que la présence de SA entraîne la formation par les bactéries soumises à son action d'enzymes biologiquement inactives. Cela rapproche de façon évidente le SA des analogues structuraux d'amino-acides, dont les effets sur des cultures d'*E. coli* ont été d'abord signalés par Munier et Cohen [19]. La comparaison entre l'action du SA et celle de ces analogues fait ressortir notamment :

a) Que le SA se rapproche des analogues « pour lesquels on obtient une respiration linéaire en fonction du temps, ce qui indique qu'un ou plusieurs enzymes du système respiratoire global ne sont plus synthétisés... Il est évident que l'arrêt de la synthèse d'un enzyme du système respiratoire rend l'apport d'énergie limitant, et ce fait suffirait à lui seul à expliquer la croissance linéaire et l'arrêt final de la croissance » [20].

b) Comparativement aux analogues d'amino-acides qui inhibent complètement la synthèse induite de la  $\beta$ -galactosidase active (4- et 5-méthyltryptophanes,  $\beta$ -2-thiénylalanine et  $\beta$ -phénylsérine) et ceux qui, comme la *p*-fluorophénylalanine et la norleucine provoquent la croissance linéaire mais n'agissent pas sur le taux différentiel de synthèse de la  $\beta$ -galactosidase active, le SA semble se trouver dans une situation intermédiaire particulière : il n'empêche pas l'apparition de la  $\beta$ -galactosidase induite, mais il la retarde, et, lorsque l'enzyme apparaît, son taux différentiel de synthèse est de loin inférieur à celui observé dans la culture témoin.

Le tableau I résume l'ensemble des effets exercés sur *E. coli* ou dans d'autres systèmes par différents analogues structuraux d'amino-acides [20 à 25] ou par des acides aminés eux-mêmes [13] et ceux que nous avons observés avec le SA.

Il nous semble intéressant de souligner le comportement différent du SA et de l'améthoptérine, en ce qui concerne les propriétés fonctionnelles des protéines synthétisées en leur présence. L'améthoptérine, on le sait, doit ses propriétés anti-foliques au fait que, comme l'aminoptérine, elle inhibe la conversion de l'acide ptéroyl-glutanique en son (ou ses) dérivé (s) actif (s), le (ou les) co-facteur (s) folique (s) [CoF] (pour bibliographie à ce sujet, voir [26]).

Ainsi, l'addition d'améthoptérine à une culture d'*E. coli* entraîne l'accumulation de 5-amino-4-imidazole-carboxamide ribotide [27]. L'accumulation de ce même composé est également observée dans des cultures d'*E. coli* soumises à l'action des sulfamides (pour bibliographie à ce sujet, voir [28]). Mais, dans le cas de l'améthoptérine, le blocage de la synthèse *de novo* de l'acide inosinique ne s'accompagne ni d'une croissance linéaire du germe, ni d'autres phénomènes indiquant une modification de l'activité biologique des protéines synthétisées.

TABLEAU I.

	CROISSANCE LINÉAIRE	RESPIRATION LINÉAIRE	$\beta$ -GALACTOSIDASE CONSTITUTIVE	$\beta$ -GLUCURONIDASE CONSTITUTIVE	$\beta$ -GALACTOSIDASE INDUITE	$\beta$ -GLUCURONIDASE INDUITE	PHOSPHATASE ALCALINE	ADAPTATION AUX SUCRES
$\beta$ -2-thiénylalanine .	+	+			totalement inhibée	inhibée		
<i>p</i> -fluorophénylalanine . . . . .	+	—	non inhibée		non inhibée		non inhibée	inhibée
Norleucine . . . . .	+	—			non inhibée			
$\beta$ -phénylsérine . . . . .	+				totalement inhibée			
5-méthyltryptophane . . . . .	+	+			totalement inhibée			
Valine (souche K12 Vs d' <i>E. coli</i> ) . . . . .	+	+	inhibée	inhibée	totalement inhibée			inhibée
SA . . . . .	+	+	inhibée	partiellement inhibée	partiellement inhibée	inhibée	inhibée	retardée

Dans le cas du SA, au contraire, les phénomènes que nous avons observés (notamment, la croissance et la respiration linéaires et la modification du taux de synthèse de certaines enzymes) montrent que l'action du SA sur *E. coli* affecte d'une manière primordiale la synthèse des protéines.

## RÉSUMÉ.

L'introduction de *p*-aminophénylsulfamide dans des cultures bactériennes en voie de croissance exponentielle provoque divers phénomènes : la croissance et la respiration deviennent linéaires, le taux différentiel de synthèse de certaines enzymes adaptatives

ou constitutives est modifié. Ces phénomènes, déjà observés avec des analogues d'amino-acides, montrent que le *p*-aminophényl-sulfamide affecte de manière primordiale la synthèse des protéines.

## SUMMARY

### STUDIES ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF SULFANILAMIDE. ACTION OF SULFANILAMIDE ON THE SYNTHESIS OF BACTERIAL PROTEINS.

When added to bacterial cultures in the exponential phase, the sulfanilamide brings about various effects : growth and respiration become linear and the differential rate of synthesis of various enzymes is altered. These effects, already observed with some analogs of amino-acids, suggest that protein synthesis is drastically affected by the sulfanilamide.



Nous remercions M. J. Monod et ses collaborateurs, du Service de Biochimie cellulaire de l'Institut Pasteur, ainsi que M. G. Milhaud, du Laboratoire des Isotopes de l'Institut Pasteur, de l'intérêt qu'ils ont manifesté pour notre travail et de l'aide qu'ils nous ont apportée à des titres divers.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAMENSANS (A.) et FARI (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 226.
- [2] RICKENBERG (H. V.), COHEN (G. N.), BUTTIN (G.) et MONOD (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 829.
- [3] STOEBER (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 950.
- [4] STOEBER (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 1091.
- [5] MONOD (J.), COHEN-BAZIRE (G.) et COHEN (M.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1951, **7**, 585.
- [6] TORRIANI (A.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1960, **38**, 460.
- [7] NAONO (S.) et GROS (F.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 3889.
- [8] BRITTON (R. J.), ROBERTS (R. B.) et FRENCH (E. F.). *Proc. Nat. Acad. Sci. New York*, 1955, **41**, 863.
- [9] LAMENSANS (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 172.
- [10] LAMENSANS (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 855.
- [11] ALIMCHANDANI (H. R.) et SREENIVASAN (A.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 171.
- [12] ALIMCHANDANI (H. R.) et SREENIVASAN (A.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 175.
- [13] COHEN (G. N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 15.
- [14] LAMENSANS (A.) et FARI (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 71.
- [15] MONOD (J.), PAPPENHEIMER (A. M. Jr) et COHEN-BAZIRE (G.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1952, **9**, 648.
- [16] LWOFF (A.) et MONOD (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 323.
- [17] LWOFF (A.), NITTI (F.), TRÉFOUËL (M<sup>me</sup> J.) et HAMON (V.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **67**, 9.

- [18] LWOFF (A.), NITTI (F.) et TRÉFOUËL (M<sup>me</sup> J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1941, **67**, 173.
- [19] MUNIER (R.) et COHEN (G. N.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1956, **21**, 592.
- [20] COHEN (G. N.) et MUNIER (R.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1959, **31**, 347.
- [21] MUNIER (R.) et COHEN (G. N.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1959, **31**, 378.
- [22] JANECK (J.) et coll. *Folia Microbiol.*, 1960, **5**, 207.
- [23] MUNIER (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 1870.
- [24] MUNIER (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 3524.
- [25] VAUGHAN (M.) et STEINBERG (D.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1960, **40**, 230.
- [26] MANDEL (H. G.). *Pharmacol. Rev.*, 1959, **2**, 791 et suite.
- [27] TOMISEK (A. J.), KELLY (H. J.), REID (M. J.) et SKIPPER (H. E.). *Arch. Bioch. Bioph.*, 1958, **76**, 45.
- [28] GREENBERG (G. R.) et JAENICKE (L.). *Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Purines*, J. A. Churchill Ltd., édit., Londres, 1957, 204.

---

## RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA CHIMIOTHÉRAPIE DU TRACHOME

par G. H. WERNER (\*)

(*Laboratoire de Recherches de la Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc (Centre Nicolas Grillet), Vitry-sur-Seine*)

### INTRODUCTION

Jusqu'à une date récente, la thérapeutique antitrachomateuse se ressentait de l'incertitude où l'on se trouvait concernant l'étiologie de cette affection. Malgré les succès obtenus cliniquement avec la sulfamidothérapie et l'antibiothérapie, le fait que des infections bactériennes soient fréquemment associées au trachome ne permettait pas d'affirmer que ces diverses thérapeutiques agissaient directement sur l'agent étiologique propre, présumé viral, du trachome.

Depuis l'isolement du virus du trachome par T'ang et coll. en 1957 [1], découverte confirmée par Collier et Sowa en 1958 [2], puis, en 1959, par Bell et coll. [3], par Bernkopf et coll. [4], par Hanna et coll. [5], et enfin en 1960, par Grayston et coll. [6], il est devenu possible d'étudier au laboratoire, avec toute la précision voulue, le problème de la chimiothérapie de cette affection.

Par ses propriétés biologiques et par la possession de l'antigène déviant le complément spécifique de ce groupe, le virus du trachome appartient au groupe *Bedsonia* (Meyer), représenté par les virus (1) de la psittacose et de la lymphogranulomatose. Il était donc permis de supposer que, comme ces derniers, il se montrerait sensible à certains sulfamides et à certains antibiotiques. Les caractéristiques propres du virus du trachome à cet égard restaient cependant à préciser, étant donné que les virus déjà connus de ce groupe diffèrent considérablement dans leur sensibilité aux agents chimiothérapeutiques.

Le présent article résume les résultats des essais de laboratoire effectués dans ce sens et met en lumière l'activité expérimentale particulièrement marquée de certains produits.

(\*) Manuscrit reçu le 16 septembre 1960.

(1) Bien que le terme de « virus » ne soit pas adéquat pour désigner les microorganismes du groupe *Bedsonia*, nous l'emploierons ici faute d'un vocable plus spécifiquement descriptif.

## MÉTHODES.

1<sup>o</sup> SOUCHES DE VIRUS.

Les deux souches de virus utilisées nous ont été aimablement remises par le Dr L. H. Collier (Medical Research Council's Trachoma Research Group, Lister Institute of Preventive Medicine, Londres) en octobre 1959. Il s'agit de la souche T'ang, qui est l'une des souches isolées à Pékin par T'ang et coll. [1], et de la souche G1, isolée en Gambie (Afrique Occidentale) par Collier et Sowa [2]. Ces deux souches ont été isolées par inoculation dans le sac vitellin de l'œuf de poule embryonné de frottis de la conjonctive palpébrale de malades atteints de trachome en pleine activité (stades II et III selon la classification de Mc Callan). Collier, Duke-Elder et Jones [7] ont montré que le virus de la souche G1, après huit passages dans l'œuf, était capable, par instillation dans la conjonctive d'un volontaire, de causer l'apparition, dans l'œil infecté, du tableau clinique et histologique typique du trachome, avec possibilité de réisolation du virus. D'autre part, les auteurs chinois [1] ont obtenu des conjonctivites folliculaires, parfois accompagnées d'inclusions, chez des *Macacus rhesus* inoculés sur la conjonctive avec la souche T'ang.

2<sup>o</sup> CULTURE « IN OVO » DES SOUCHES DE VIRUS.

Nous avons cultivé les souches G1 et T'ang dans le sac vitellin de l'œuf de poule Leghorn embryonné ayant sept jours d'incubation. Dans les deux cas, 0,125 ml d'une dilution appropriée du virus a été inoculé dans le sac vitellin de chaque œuf, et les œufs ont été incubés entre 35 et 36° et mirés quotidiennement.

Avec la souche T'ang, la mortalité des embryons est relativement précoce, leur survie moyenne après inoculation étant d'environ cinq jours ; en général, aucun œuf ne survit jusqu'à l'éclosion. Toutefois, lorsque nous avons inoculé dans le sac vitellin des suspensions très peu diluées de virus T'ang, nous avons observé une mortalité encore plus précoce, sans doute due à un phénomène de toxicité, mais, en outre, un certain nombre d'œufs ont survécu jusqu'à l'éclosion, ce qui peut s'expliquer par un phénomène d'auto-interférence.

Avec la souche G1, la mortalité est moins précoce qu'avec la souche T'ang, la survie moyenne des embryons après l'inoculation étant d'environ neuf jours ; en outre, dans une série

de dix à quinze œufs inoculés avec cette souche, quelle qu'en soit la dilution, il n'est pas rare qu'un petit nombre d'œufs survive jusqu'à l'élosion.

Pour conserver les souches, nous avons prélevé les sacs vitellins des œufs morts aux cinquième et sixième jours pour la souche T'ang et aux neuvième et dixième jours pour la souche G1 et nous avons préparé des suspensions de 20 g dans 100 ml dans une solution de tampon saccharose-glutamate du type Bovarnick et coll. [8]; ces suspensions ont été conservées à — 70° dans des ampoules Pyrex scellées.

Des titrages du pouvoir infectant, dans le sac vitellin de l'œuf, de ces suspensions de la souche T'ang ont montré que leur titre atteignait en moyenne 10<sup>8</sup> DL50 par ml.

Nous avons préparé des frottis sur lames de sacs vitellins infectés avec l'une ou l'autre de ces deux souches de virus, et nous avons coloré ces frottis avec le colorant de May-Grunwald-Giemsa : des corpuscules élémentaires, plus souvent extracellulaires qu'intracellulaires, ont été observés, conformes aux descriptions des auteurs chinois et anglais. D'une manière générale, cependant, il nous a paru plus commode d'évaluer la multiplication des virus par la mortalité des embryons, laquelle est très régulière.

### 3<sup>e</sup> VIRULENCE POUR LA SOURIS.

Dans leur article original, T'ang et coll. [4] font état de résultats négatifs lors de l'essai d'infection intracérébrale de la souris avec une de leurs souches. Leurs essais étaient effectués avec une souche ayant subi un nombre relativement peu élevé de passages dans le sac vitellin de l'œuf et dont la DL50 par ml pour l'embryon de poulet était de l'ordre de 10<sup>4</sup>. Nous avons repris ces essais avec des suspensions de virus de la souche T'ang titrant, dans l'œuf, 10<sup>8</sup> DL50 par ml. Nos souris étaient des souris blanches non sélectionnées provenant d'un même éleveur et pesant de 15 à 18 g. Dans ces conditions, l'inoculation intracérébrale à la souris d'une dilution faible (1/4 ou 1/5) d'une suspension à 20 p. 100 de sacs vitellins d'œufs embryonnés infectés avec le virus de la souche T'ang a provoqué la mort de l'animal dans les deux à cinq jours suivant l'infection.

Les constatations histopathologiques ont été les suivantes (2) : méningoencéphalite aiguë diffuse avec atteinte particulièrement marquée des régions paraventriculaires, infiltration hémorragique du corps calleux, petits raptus hémorragiques périvasculaires en

(2) L'examen histopathologique a été effectué par le Dr Ganter.

différentes zones de l'encéphale et du cervelet. Congestion des vaisseaux méningés et infiltration inflammatoire autour du sinus longitudinal supérieur.

La souris nous a semblé être presque aussi sensible que l'œuf embryonné au virus de la souche T'ang. Une suspension de sacs vitellins infectés titrant  $10^8$  DL<sub>50</sub> par ml sur œuf, a tué 4 souris sur 5 à la dilution  $10^{-6}$ . Toutefois, les souris inoculées intracérébralement avec une suspension peu diluée de virus, meurent plus rapidement (survie moyenne : environ trois jours) que celles qui reçoivent par la même voie, une suspension plus diluée du virus (survie moyenne : six à huit jours après l'inoculation). On peut en conclure que, lors de l'inoculation intracérébrale de doses massives de virus, il se produit un phénomène de toxicité virale analogue à celui que l'on observe avec d'autres virus du groupe psittacose-lymphogranulomatose [9].

Notons d'ailleurs qu'en 1958, Giroud et coll. [10] avaient réussi l'isolement et la culture de produits à activité trachomateuse sur la souris et d'autres petits rongeurs.

#### 4° PRÉPARATION D'ANTISÉRUMS ET ESSAIS DE NEUTRALISATION CROISÉE « IN OVO » ET CHEZ LA SOURIS.

Nous avons immunisé des cobayes et des souris, par la voie intrapéritonéale, contre les souches T'ang et G1 en vue d'obtenir des antisérum spécifiques.

Deux cobayes ont reçu 4 inoculations intrapéritonéales, espacées de 4 jours, de 2 ml d'une suspension à 20 p. 100 de sacs vitellins infectés avec la souche T'ang et 2 autres cobayes ont été immunisés de la même manière avec la souche G1. Les cobayes ont été saignés dix-neuf jours après la première inoculation.

D'autre part, 15 souris ont reçu 4 inoculations intrapéritonéales, espacées de trois jours, de 0,5 ml d'une suspension à 40 p. 100 de sacs vitellins infectés avec la souche T'ang et 15 autres souris ont été immunisées de la même manière avec la souche G1. Les souris ont été saignées par décapitation vingt-deux jours après la première inoculation.

Dans les essais de neutralisation *in ovo*, les deux pools d'antisérum de cobayes (anti-T'ang et anti-G1), ainsi que du sérum de cobaye normal non immunisé, ont été inactivés à 56° et dilués au 1/3 en liquide physiologique tamponné (PBS) [11] et mélangés avec des volumes égaux de dilutions, allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ , de la souche T'ang, également en PBS. Ces mélanges ont été laissés une heure à la température du laboratoire, puis chaque mélange a été inoculé, sous un volume de 0,125 ml, dans le sac vitellin

de 5 œufs incubés depuis sept jours. La DL50 a été calculée pour chacune des trois séries, par la méthode de Reed et Muench [42].

D'autre part, les deux pools d'antisérum de souris, ainsi qu'un pool de sérum provenant de souris normales non immunisées, ont été inactivés à 56°, dilués au 1/2 en PBS et mélangés avec des volumes égaux de dilutions de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-9</sup> de la souche T'ang. Ces mélanges ont été incubés trente minutes à 37°, puis un volume de 0,125 ml de chaque mélange a été inoculé, dans le sac vitellin de 4 œufs ayant sept jours d'incubation. La DL50 a été calculée pour chacune des trois séries.

Enfin nous avons effectué un essai de neutralisation sur souris de la manière suivante : nous avons immunisé par la voie intraperitoneale un premier groupe de souris contre la souche T'ang et un deuxième groupe de souris contre la souche G1 (3 inoculations, espacées de trois jours, de suspensions à 40 p. 100 de sacs vitellins infectés) ; nous avons infecté par voie intracérébrale les souris des deux groupes, ainsi que des souris témoins, avec la souche T'ang et nous avons déterminé la survie moyenne de chaque lot.

### 5° ESSAIS D'AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES.

a) *In ovo* : La plupart des essais ont porté sur la souche T'ang et les résultats de ces essais ont été confirmés sur la souche G1.

Les œufs embryonnés Leghorn ayant sept jours d'incubation ont été inoculés dans le sac vitellin avec 10<sup>6</sup> DL50 de virus. Une heure après l'inoculation du virus, on a injecté dans le sac vitellin des œufs 0,125 ml de la solution du produit à essayer. Les œufs ont été incubés à 35 - 36° et mirés quotidiennement : les morts occasionnelles survenant dans les quarante-huit heures suivant l'inoculation ont été considérées comme non spécifiques et il n'en a pas été tenu compte dans l'évaluation de la survie moyenne de la série.

Les séries témoins-virus comprenaient 15 œufs ; chaque dose de produit essayée a été injectée dans 10 œufs. Tous les produits essayés ont été mis en solution aqueuse avant leur injection dans le sac vitellin. Dans certains cas, il a fallu pour cela injecter des solutions à pH nettement alcalin ou acide : des essais-témoins ont montré que le pH (de 3 à 9) de la solution injectée dans le sac vitellin, sous un volume de 0,125 ml, une heure après l'infection, n'avait aucune influence sur la multiplication du virus et sur la mortalité des embryons.

Afin d'éviter l'inconvénient d'éclosions survenant dans l'étuve,

les œufs survivant le treizième jour après l'inoculation ont été détruits à ce moment, c'est-à-dire la veille de l'élosion.

La survie moyenne des œufs a été calculée pour chaque série.

b) *Essais sur souris* : Pour les essais sur souris d'agents chimiothérapeutiques actifs sur le virus du trachome, nous avons utilisé l'infection intracérébrale de la souris (pesant de 16 à 18 g) avec une suspension peu diluée de sacs vitellins provenant d'œufs embryonnés infectés avec la souche T'ang. Les souris ont reçu, par voie intracérébrale, sous anesthésie à l'éther, 0,03 ml d'une dilution 1/4 ou 1/5 d'une suspension à 20 p. 100 de sacs vitellins infectés.

L'essai des produits s'est fait en administrant aux souris, par la voie sous-cutanée (s.c.) ou *per os*, en général une heure avant l'infection, une dose déterminée du produit essayé. Les produits ont été administrés en solution ou suspension aqueuse, avec addition de gomme arabique pour les traitements *per os*. Chaque lot témoin a comporté 10 souris et chaque dose de produit a été essayée sur 10 souris.

Les souris ont été observées pendant dix jours après l'inoculation (au-delà de ce délai, on n'observe plus de mortalité due à l'infection par le virus T'ang) et on a calculé la survie moyenne de chaque lot de souris.

## RÉSULTATS.

### 1<sup>o</sup> RELATIONS ANTIGÉNIQUES ENTRE LA SOUCHE T'ANG ET LA SOUCHE G1.

Le tableau I indique les résultats des essais de neutralisation *in ovo* du virus de la souche T'ang avec des immunsérum de

TABLEAU I. — Neutralisation *in ovo* de la souche T'ang par des immunsérum homologues ou hétérologues.

	SÉRUMS DE COBAYE		SÉRUMS DE SOURIS	
	log <sub>10</sub> DL <sub>50</sub> après incubation avec le sérum	Indice de neu- trali- sation (*)	log <sub>10</sub> DL <sub>50</sub> après incubation avec le sérum	Indice de neu- trali- sation (*)
Sérum normal ..	7,3		8,1	
Sérum anti-T'ang	6,0	20 DL <sub>50</sub>	6,9	16 DL <sub>50</sub>
Sérum anti-G 1 .	6,4	8 DL <sub>50</sub>	6,9	16 DL <sub>50</sub>

(\*) Nombre de DL<sub>50</sub> neutralisées par le sérum.

cobayes ou de souris immunisés avec les souches T'ang et G1 respectivement.

Les indices de neutralisation obtenus sont peu élevés, mais ils sont comparables pour les deux souches, ce qui montre la parenté antigénique entre T'ang et G1.

Le tableau II donne les résultats de l'essai d'immunité croisée effectué sur souris ; dans cet essai, des souris immunisées préalablement contre les souches T'ang ou G1 et des souris témoins ont reçu une inoculation intracérébrale de virus de la souche T'ang. Les souris témoins (ayant reçu une suspension de sacs vitellins d'oeufs normaux) n'ont pas résisté à cette infection, tandis que les souris immunisées contre la souche T'ang ont montré une résistance pratiquement totale à l'infection par le virus homologue. Les souris immunisées contre la souche G1 ont résisté partiellement à l'infection intracérébrale par le virus T'ang. Ces résultats démontrent l'existence d'une immunité croisée, au moins partielle, entre les deux souches.

TABLEAU II. — Immunité croisée chez la souris entre les souches T'ang et G1 de virus du trachome.

LOT	SURVIE MOYENNE APRÈS INOCULATION I.C. AVEC T'ANG (maximum : 10 jours)	SOURIS SURVIVANTES 10 JOURS APRÈS L'INOCULATION I.C. AVEC T'ANG
Souris-témoins (« immunisées » avec une suspension de sacs vitellins non infectés) .....	4,7 jours	1 sur 10
Souris immunisées contre la souche T'ang .....	9,1 jours	8 sur 9
Souris immunisées contre la souche G1 .....	7,1 jours	5 sur 10

Les souris ont été immunisées par 3 inoculations i. p. (espacées de trois jours) d'une suspension de sacs vitellins normaux ou infectés avec les souches T'ang ou G1. Quatorze jours après la première immunisation, elles ont été inoculées i. c. avec la souche T'ang.

## 2<sup>e</sup> ACTION D'AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES « IN OVO ».

L'évaluation des survies moyennes des œufs témoins, infectés et non traités, au cours de 25 séries d'essais, échelonnées sur cinq mois, en a montré la très grande régularité : avec la souche T'ang, la moyenne des survies moyennes des œufs après inoculation dans le sac vitellin a été de 5,2 jours avec un écart quadratique moyen de 0,8 jour.

Pour évaluer l'activité des produits essayés, nous avons adopté la formule :

$$P = \frac{100 (S_x - S_t)}{13 - S_t}.$$

$P$  étant le *pourcentage de protection* de la série d'œufs traités avec une dose déterminée de produit,  $S_x$  la survie moyenne de ces œufs (en jours),  $S_t$  la survie moyenne des œufs témoins (infectés et non traités) de l'essai correspondant. La survie moyenne maxima d'œufs traités est de treize jours (tous les embryons

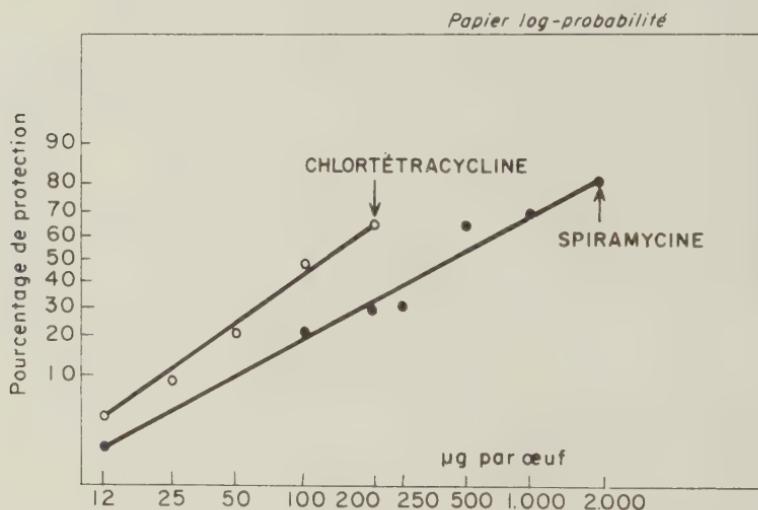


FIG. 1. — Action *in ovo* d'antibiotiques sur le virus du trachome (souche Tang). Variation du pourcentage de protection des œufs embryonnés en fonction de la dose de produit injectée.

vivants la veille de l'élosion) : dans ce cas, le pourcentage de protection est égal à 100 p. 100.

Nous avons constaté que, si sur du papier logarithme-probabilité on porte en abscisses les doses de produit essayées (en  $\mu\text{g}$  par œuf) et en ordonnées les pourcentages de protection des œufs traités par les doses correspondantes, les points obtenus se répartissent de manière satisfaisante autour d'une ligne droite (Voir fig. 1, à titre d'exemple).

Nous avons calculé le pourcentage de protection correspondant à une survie moyenne égale à la survie moyenne des œufs témoins + quatre fois l'écart quadratique moyen ; ce pourcentage est de

41 p. 100. Pour chaque produit essayé, nous avons déterminé le point où la droite exprimant la variation du pourcentage de protection en fonction de la dose injectée coupe l'horizontale correspondant à l'ordonnée 41 p. 100 : l'abscisse de ce point donne la dose minima active, c'est-à-dire la dose minima permettant une augmentation significative de la survie des embryons infectés.

TABLEAU III. — Activité d'agents chimiothérapeutiques sur la multiplication *in ovo* des souches T'ang et G1 de virus du trachome.

PRODUIT	SOUCHE T'ANG DOSES MINIMA ACTIVES (par œuf)	SOUCHE G 1 DOSES MINIMA ACTIVES (par œuf)
Sulfanilamide .....	90 µg	
Sulfaméthopyrazine .....	8 µg	25 µg
Sulfamérazine .....	6 µg	
Tétracycline (chlorhydrate) .....	14 µg	10 µg
Chlortétracycline (chlorhydrate) .....	90 µg	200 µg
Oxytétracycline (chlorhydrate) .....	6 µg	10 µg
Déméthylchlortétracycline (chlorhydrate) .....	9 µg	25 µg
Erythromycine (base) ...	16 µg	25 µg
Spiramycine (base) ....	300 µg	200 µg
Oléandomycine (base) ...	50 µg	100 µg
Pénicilline G (sel de Na)	12 µg	25 µg
Chloramphénicol .....	200 µg	200 µg
Streptomycine (sulfate) .	Inactive à 5 mg par œuf	
Néomycine (sulfate) ....	Inactive à 0,5 mg par œuf	

Les essais d'activité de produits *in ovo* contre la souche G1 ont été plus difficiles à évaluer, puisque, comme nous l'avons indiqué plus haut, la mortalité des œufs inoculés avec ce virus est tardive et souvent irrégulière. Nous nous sommes donc bornés à essayer contre cette souche des doses de produits voisines des doses minima actives déterminées avec précision sur la souche T'ang, si bien que nos résultats ne donnent que des valeurs approchées des doses minima actives vis-à-vis de la souche G1.

Le tableau III résume l'ensemble des résultats obtenus *in ovo* avec les souches T'ang et G1. On voit qu'il n'y a pas de différence

notable de sensibilité aux divers produits entre la souche T'ang et la souche G1.

Les activités *in ovo* les plus considérables ont été celles des sulfamides (sulfamérazine, sulfaméthopyrazine), de la pénicilline G et des tétracyclines. La chlortétracycline (auréomycine) a cependant une activité *in ovo* inférieure à celle des autres tétracyclines. Parmi les antibiotiques à structure macrolide, l'érythromycine se distingue par une activité supérieure à celle de l'oléandomycine et de la spiramycine. Le chloramphénicol est relativement peu actif. La streptomycine et la néomycine sont inactives.

### 3° ACTION D'AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES CHEZ LA SOURIS INFECTÉE PAR LA VOIE INTRACÉRÉBRALE.

Chez la souris recevant par la voie intracérébrale une suspension peu diluée (1/4 ou 1/5) de virus de la souche T'ang, la survie moyenne après inoculation a été; en l'absence de tout traitement, de 2,5 jours (moyenne des observations sur 13 lots de 10 souris) avec un écart quadratique moyen égal à 1,3 jour.

Pour chaque dose de produit essayée, nous avons calculé le pourcentage de protection selon la formule :

$$P = \frac{100 (S_x - S_t)}{10 - S_t}.$$

$S_x$  étant la survie moyenne des souris traitées,  $S_t$  celle des souris témoins (infectées, non traitées) de l'essai correspondant. Le pourcentage de protection correspondant à une prolongation de survie moyenne égale à quatre fois l'écart quadratique moyen est  $P = 69$  p. 100. Au-delà de cette valeur de pourcentage de protection, on peut donc affirmer que le produit a une activité hautement significative.

Le tableau IV indique, pour chaque produit essayé, la dose utilisée, la voie d'administration, le pourcentage de protection obtenu et, au dixième jour après l'infection, le nombre de souris survivantes dans chaque lot. Dans le cas des produits les plus importants, les chiffres donnés représentent la moyenne de plusieurs observations comparables.

Il convient de noter que, dans ces essais sur souris, l'infection avec une dose massive de virus est particulièrement sévère, puisque, en plus de l'infection proprement dite, elle met en jeu un phénomène de toxicité virale. En général, chez les souris témoins non traitées, aucune souris n'a survécu jusqu'au dixième jour après l'infection.

Le tableau IV met en évidence l'activité particulièrement mar-

TABLEAU IV. — Action de sulfamides et d'antibiotiques sur l'infection de la souris par le virus du trachome (souche T'ang).

PRODUIT	DOSES S.C. mg/kg				DOSES PER OS mg/kg		
	25	50	100	250	250	500	1000
Sulfaméthopyrazine . . .	85 % 5/10	89 % 9/10	85 % 8/10	100 % 10/10	86 % 8/10	98 % 9/10	—
Sulfamérazine . . . . .		90 % 8/10		84 % 8/10	69 % 7/10		
Sulfanilamido-3 phényl-2 pyrazole . . .					96 % 9/10		
Sulfadiméthoxine . . . .					75 % 8/10		
Sulfadiazine . . . . .		100 % 10/10					
Sulfadimérazine . . . .		34 % 0/10					
Sulfathiazol . . . . .		8 % 0/10					
Sulfathiourée . . . . .		0 % 0/10					
Sulfacétamide . . . . .		0 % 0/10					
Sulfanilamide . . . . .				21 % 0/10		28 % 0/10	
Tétracycline (chlorhydrate) . . . .	87 % 7/10	92 % 9/10	94 % 9/10		30 % 1/10		
Chlortétracycline (chlorhydrate) . . . .	71 % 6/10	92 % 9/10	86 % 9/10		44 % 3/10		
Oxytétracycline (chlorhydrate) . . . .	51 % 2/10	86 % 8/10	98 % 9/10		61 % 5/10		
Déméthylchlortétracycline (chlorhydrate) .	100 % 10/10	100 % 10/10	100 % 10/10		77 % 7/10		
Chloramphénicol . . . . .			7 % 0/10				
Pénicilline G (sel de Na)			12 % 0/10				
Pénicilline V (acide) . .						0 % 0/10	
Erythromycine (base) . .			53 % 0/10		65 % 5/10	89 % 6/10	
Spiramycine (base) ..			14 % 0/10		14 % 1/10	89 % 8/10	
Oléandomycine (base) . .			19 % 1/10		32 % 1/10	50 % 4/10	

Un seul traitement, une heure avant l'infection. Les chiffres indiquent le pourcentage de protection et le nombre de souris survivantes au dixième jour après l'inoculation.

quée, aussi bien par la voie sous-cutanée que *per os*, de nouveaux sulfamides, tels que la sulfaméthopyrazine (3) et le sulfanilamido-3 phényl-2 pyrazole (4) et, à un moindre degré, la sulfamérazine (5) et la sulfadiméthoxine (6). Avec la sulfaméthopyrazine, dans des essais qui ne sont pas consignés dans ce tableau, nous avons obtenu des survies hautement significatives en administrant aux souris, une heure avant l'infection, une dose unique aussi faible que 50 mg/kg *per os*.

Au contraire, de nombreux autres sulfamides moins récents, essayés uniquement par la voie sous-cutanée, se sont montrés pratiquement dénués d'activité, la seule exception étant représentée par la sulfadiazine. Le contraste entre les anciens et les nouveaux sulfamides est particulièrement frappant lorsque l'on compare les résultats obtenus avec la sulfanilamide et ceux qu'ont donnés la sulfaméthopyrazine, quel que soit le mode d'administration des produits. Comme l'indique le tableau IV, les tétracyclines se sont montrées également très actives, mais surtout par la voie sous-cutanée. La déméthylchlortétracycline (7) semble se distinguer par une activité particulièrement marquée : elle a, en outre, une activité intéressante *per os*, alors que les autres tétracyclines sont peu actives par cette voie. La chlortétracycline (auréomycine), moins active *in ovo* que les autres tétracyclines, ne montre pas cette différence chez la souris.

Les antibiotiques à structure macrolide ont une activité beaucoup plus restreinte et uniquement lorsqu'ils sont administrés *per os*. Comme dans les essais *in ovo*, l'érythromycine semble avoir une légère supériorité sur la spiramycine et l'oléandomycine.

Dans l'ensemble, les résultats des essais sur souris confirment ceux qui ont été obtenus *in ovo*, lesquels avaient également souligné la supériorité des sulfamides et des tétracyclines. Cependant, certains produits actifs *in ovo*, tels que la pénicilline G et le chloramphénicol, n'ont eu aucune activité chez la souris.

#### 4° ESSAI DE L'ACTIVITÉ-RETARD DE CERTAINS PRODUITS

Sur la souris infectée par la voie intracérébrale avec une dose massive de virus de la souche T'ang, nous avons essayé l'activité-retard éventuelle de certains sulfamides. Les essais ont

(3) Sulfaméthopyrazine : sulfanilamido-3 méthoxy-6 pyridazine : Sultirène (N. D. Rhône-Poulenc-Spécia).

(4) Sulfanilamido-3 phényl-2 pyrazole : Orisul (N. D.).

(5) Sulfamérazine : sulfanilamido-2 méthyl-4 pyrimidine : Sumédine (N. D. Rhône Poulenc-Spécia).

(6) Sulfadiméthoxine : diméthoxy-2, 4 sulfanilamido-6 diazine-1,3 : Madribon (N. D.).

(7) Déméthyl-6 chlortétracycline : Déclomycine (N. D.).

consisté à administrer *per os*, en une seule fois, une dose déterminée du produit essayé, puis à infecter les souris à des intervalles variables : quarante-huit heures, vingt-quatre heures, une heure après le traitement. Comme dans les essais précédemment décrits, l'évaluation des résultats a été faite par le calcul du pourcentage de protection et du nombre de souris survivantes dix jours après l'infection.

Le tableau V résume certains des résultats obtenus et indique

TABLEAU V. — Activité-retard de 4 sulfamides sur l'infection i. c. de la souris par le virus du trachome (souche T'ang).

INTERVALLE ENTRE TRAITEMENT ET INFECTION	PRODUIT	POURCENTAGE DE PROTECTION	SOURIS SURVIVANTES 10 JOURS APRÈS L'INFECTION
48 heures	Sulfaméthopyrazine	47 %	5 sur 10
	Sulfanilamido-3 phényl-2 pyrazole	30 %	3 sur 10
	Sulfadiméthoxine	14 %	2 sur 10
24 heures	Sulfaméthopyrazine	78 %	6 sur 10
	Sulfanilamido-3 phényl-2 pyrazole	14 %	3 sur 10
	Sulfadiméthoxine	57 %	6 sur 10
1 heure	Sulfamérazine	70 %	8 sur 10
	Sulfaméthopyrazine	87 %	9 sur 10
	Sulfanilamido-3 phényl-2 pyrazole	96 %	9 sur 10
—	Sulfadiméthoxine	75 %	8 sur 10
	Sulfamérazine	77 %	8 sur 10

Dose unique : 250 mg/kg *per os*.

la supériorité assez marquée de la sulfaméthopyrazine à cet égard.

A noter que la démethylchlortétracycline, active lorsque le traitement *per os* précède d'une heure l'infection, n'a aucune action retard après un délai plus prolongé.

#### CONCLUSIONS.

Dans son exposé sur l'état actuel de la chimiothérapie du trachome, paru en 1957, Bietti [43], se basant exclusivement sur des données cliniques, seules connues à cette époque, avançait l'hypothèse que les substances chimiothérapeutiques affectant le tableau

microbiologique propre au trachome, le tableau clinique et la flore bactérienne conjonctivale surajoutée, étaient les sulfamides et, par ordre croissant d'efficacité, la pénicilline G, le chloramphénicol et les tétracyclines. D'autre part, parmi les substances probablement inactives sur le virus du trachome, mais agissant sur la flore bactérienne associée, on trouvait en particulier la streptomycine et la néomycine.

A la suite de nos études de laboratoire résumées dans le présent article, et portant sur deux souches de virus du trachome dont nous avons montré l'étroite parenté antigénique, on voit qu'il n'y a pratiquement rien à changer à ces conclusions. Aussi bien dans les essais sur souris que dans les essais effectués *in ovo*, l'efficacité incontestable de certains sulfamides et des tétracyclines a été expérimentalement démontrée.

T'ang et coll. [4] qui, les premiers, isolèrent le virus du trachome, ont donné en 1957 les résultats de quelques essais préliminaires, effectués *in ovo*, sur l'activité de certaines substances sur ce virus. Ils ont conclu à l'activité marquée du sulfamide qu'ils ont essayé (sulfacétamide), de la pénicilline G et de l'oxytétracycline, à l'activité médiocre de la chlortétracycline et du chloramphénicol, à l'inactivité de la streptomycine. Toutefois, les doses des produits que ces auteurs essayèrent étaient élevées et nous avons pu montrer qu'avec des produits comme les sulfamides et les tétracyclines, l'activité antivirale était beaucoup plus prononcée. En outre, grâce à la virulence de l'une des souches utilisées pour la souris, nous avons pu mettre en évidence l'activité considérable de ces substances dans le cas d'une infection intracérébrale massive de l'animal. Nous avons également reconnu l'activité remarquable de la démethylchlortétracycline et constaté que la chlortétracycline (auréomycine), bien que moins active *in ovo* que les autres tétracyclines, était efficace chez l'animal.

L'activité particulièrement marquée de la sulfaméthopyrazine, *in ovo* et chez la souris, soit *per os*, soit par la voie sous-cutanée, est une des conclusions importantes qui peuvent se dégager de nos essais. Là encore, les données du laboratoire confirment les conclusions cliniques de Bietti et Lanzieri [14] indiquant l'efficacité considérable de ce produit qui, grâce à son activité-retard, que nous avons également constatée au laboratoire, permet le traitement du trachome tout en réduisant la fréquence des prises du médicament.

Nos essais permettent aussi de conclure que les antibiotiques à structure macrolide (érythromycine, spiramycine, oléandomycine) ont, sur le virus du trachome, une activité non négligeable, bien que plus modeste que celle des sulfamides récents et des tétracyclines.

Dans le groupe *Bedsonia*, le spectre de sensibilité du virus du trachome aux divers agents chimiothérapeutiques se rapproche davantage de celui du virus de la lymphogranulomatose que de celui de la psittacose [15, 16, 17, 18]. Toutefois, le virus du trachome semble se distinguer par sa sensibilité particulièrement élevée à certains sulfamides.

Il n'existe encore aucune donnée expérimentale concernant la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques du virus de la conjonctivite à inclusions, qui a été récemment isolé en Angleterre [19]. Les analogies biologiques et antigéniques entre ce virus et celui du trachome permettent cependant de supposer que leur comportement vis-à-vis des agents chimiothérapeutiques est comparable.

#### RÉSUMÉ.

Une série de produits chimiothérapeutiques (sulfamides et antibiotiques) ont été essayés en ce qui concerne leur activité éventuelle sur le virus du trachome.

Les essais ont porté sur les souches T'ang (Pékin) et G1 (Gambie) dont des essais de neutralisation *in ovo* et d'immunité croisée chez la souris ont permis de constater l'étroite parenté antigénique.

L'activité des produits étudiés a été déterminée *in ovo*, dans le sac vitellin de l'œuf de poule embryonné, et chez la souris inoculée intracérébralement avec la souche T'ang et recevant des traitements sous-cutanés ou *per os*.

Les résultats des essais *in ovo* et de ceux sur souris ont concordé pour montrer l'activité particulièrement marquée de certains sulfamides (p. ex. la sulfaméthopyrazine) et des tétracyclines (spécialement la démethylchlortétracycline). Les antibiotiques à structure macrolide (érythromycine, spiramycine, oléandomycine) ont été actifs à la condition d'employer des doses élevées.

La pénicilline G, le chloramphénicol, actifs *in ovo*, ne l'ont pas été chez la souris.

La streptomycine et la néomycine sont dénuées de toute activité.

#### SUMMARY

The activity of certain sulphonamides and antibiotics on trachoma virus has been studied in the laboratory.

The tests have been performed on two strains of trachoma virus : T'ang (Peking) and G1 (Gambia), which have been shown, by cross serum-neutralization in eggs and cross-protection in mice, to be closely related to each other antigenically.

The activity of the drugs was determined on both strains *in ovo*, in the yolk sac of embryonated chicken eggs, and in mice inoculated intracerebrally with the Chinese strain and treated subcutaneously or orally with the compounds tried.

The results of the *in ovo* and mouse tests have generally been in good agreement. They have shown the remarkable activity of certain sulphonamides and of the *tetracycline antibiotics*. Sulphamethopyrazine on the one hand, and demethylchlortetracycline on the other hand, have been the most active drugs.

Antibiotics with a macrolide structure (erythromycin, spiramycin, oleandomycin) have been active at high dosages only.

Penicillin G and chloramphenicol, although active *in ovo*, had no effect when tried in mice.

Streptomycin and neomycin showed no antitrachoma activity.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] T'ANG (F. F.), CHANG (H. L.), HUANG (Y. T.) et WANG (K. C.). *Chinese med. J.*, 1957, **75**, 429.
- [2] COLLIER (L. H.) et SOWA (J.). *Lancet*, 1958, **1**, 993.
- [3] BELL (S. D. Jr), SNYDER (J. C.) et MURRAY (E.S.). *Science*, 1959, **130**, 626.
- [4] BERNKOPF (H.), NISHMI (M.), MATHYAR (B.) et FEITELBERG (I.). *A. M. A. Arch. Ophthalmol.*, 1959, **62**, 33.
- [5] HANNA (L. P.), THYGESEN (P.), JAWETZ (E.) et DAWSON (C.). *Science* 1959, **130**, 1339.
- [6] GRAYSTON (J. T.), WANG (S. P.) et JOHNSTON (P. B.). *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1960, **103**, 596.
- [7] COLLIER (L. H.), DUKE-ELDER (S.) et JONES (B. R.). *Brit. J. Ophthalmol.*, 1958, **42**, 705.
- [8] BOVARNICK (M. R.), MILLER (J. C.) et SNYDER (J. C.). *J. Bact.*, 1950, **59**, 509.
- [9] RAKE (G.) et JONES (H. P.). *J. exp. Med.*, 1944, **79**, 463.
- [10] GIROUD (P.), RENOUX (G.) et NATAF (R.). *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1958, **35**, 327.
- [11] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 167.
- [12] REED (L. J.) et MUENCH (H.). *Amer. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [13] BIETTI (G. B.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1957, **16**, 975.
- [14] BIETTI (G. B.) et LANZIERI (M.). *Rev. int. Trachome*, 1957, **34**, 270.
- [15] JONES (H.), RAKE (G.) et STEARNS (B.). *J. inf. Dis.*, 1945, **76**, 55.
- [16] HAMRE (D.) et RAKE (G.). *J. inf. Dis.*, 1947, **81**, 175.
- [17] HURST (E. W.), PETERS (J. M.) et MELVIN (P.). *Brit. J. Pharmacol.*, 1950, **5**, 611.
- [18] MARAL (R.) et CIACCIO (G.). *C. R. Soc. Biol.* 1958, **92**, 49.
- [19] JONES (B. R.), COLLIER (L. H.) et SMITH (C.H.). *Lancet*, 1959, **1**, 902.

# **SUR QUELQUES APPLICATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE A L'ÉTUDE D'ACIDES GRAS BACTÉRIENS**

par J. ASSELINEAU (\*) (\*\*).

(*Institut de Biologie physico-chimique, Paris 5<sup>e</sup>*)

La chromatographie en phase gazeuse constitue une méthode très sensible pour la détection de petites quantités d'acides gras particuliers au milieu d'acides banaux. Il était par suite tentant de l'appliquer à l'étude des mélanges d'acides provenant de lipides bactériens, pour y déceler d'éventuels acides spécifiques.

Rappelons que James et Martin [1] ont illustré les possibilités de la méthode qu'ils avaient mise au point en analysant les acides gras présents dans le milieu de culture de *Pseudomonas aeruginosa*. Plus récemment, Cason et Tavs [8] ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse pour étudier la composition des acides gras de C<sub>16</sub> à C<sub>20</sub> de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, et Labarrère et Asselineau [3] ont examiné les acides gras de la souche humaine *Canetti*. D'autre part, la chromatographie en phase gazeuse a permis à Dauchy et Asselineau [4] de mettre en évidence un acide C<sub>17</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> contenant un cycle propanique dans les lipides d'une souche d'*Escherichia coli*. L'hétérogénéité de l'acide mycocérosique du bacille tuberculeux a été démontrée par cette méthode [5].

Nous décrivons ici les résultats que nous avons eu l'occasion d'obtenir au cours de l'analyse des lipides de *Corynebacterium diphtheriae*, *C. ovis*, *Pasteurella pestis* et *Bacillus subtilis*.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES.**

*Origine des lipides bactériens.* — Nous avons utilisé les lipides totaux extraits par un mélange (1/1) d'alcool éthylique et d'éther à partir de lots de bacilles des deux souches : *Corynebacterium diph-*

(\*) Adresse actuelle : Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences de Toulouse.

(\*\*) Manuscrit reçu le 19 septembre 1960.

*theriae* (bacilles de la souche Park-Williams n° 8, cultivés sur milieu Loiseau-Philippe pendant treize jours), et *Corynebacterium ovis* (bacilles reçus du Dr H. R. Carne [Sidney]).

Un échantillon de graisses solubles dans l'acétone, provenant d'une souche de *Pasteurella pestis* a été aimablement fourni par le Dr D. A. L. Davies (Porton), et un échantillon d'acides gras provenant de la saponification des lipides totaux d'une souche de *Bacillus subtilis* a été mis à notre disposition par M<sup>le</sup> S. Dauchy (Nancy).

*Préparation des esters d'acides gras.* — Les échantillons de lipides totaux (ou les graisses solubles dans l'acétone) ont été saponifiés par chauffage à reflux sous azote pendant six heures, dans la potasse méthanolique à 5 p. 100 [p/v] (additionnée, si besoin est, d'un peu de benzène pour augmenter la solubilité des lipides). Après refroidissement, le mélange est concentré sous vide, additionné d'eau et extrait plusieurs fois à l'éther pour éliminer la partie insaponifiable. La phase aqueuse alcaline est ensuite acidifiée par l'acide sulfurique dilué, et extraite plusieurs fois par l'éther : les extraits éthérisés réunis sont lavés à l'eau jusqu'à neutralité, séchés sur  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  et amenés à sec ; ceci constitue les acides gras bruts. Les esters méthyliques sont préparés par addition d'une solution de diazométhane dans l'éther.

*Techniques chromatographiques.* — Les fractions lipidiques et les esters d'acides gras ont été fractionnés par chromatographie sur silicate de magnésium ou sur alumine dans les conditions qui ont déjà été décrites (voir par exemple [6]).

La chromatographie sur papier du glycérol, et sa révélation par oxydation périodique, ont été effectuées selon Gordon, Thornburg et Werum [7].

Les chromatographies en phase gazeuse ont été réalisées à l'aide d'un appareil Griffin and George équipé d'une colonne de cérite contenant 20 p. 100 (p/p) de « Dow Corning fluid » (silicone). Avec ce type de colonne, les esters insaturés présentent le même temps de rétention que les esters saturés [8] : nous avons constaté que le linolénate de méthyle (3 doubles liaisons) mélangé à une quantité égale de stéarate de méthyle ne fournit qu'un seul pic [3]. Pour la chromatographie des esters de  $\text{C}_{10}$  à  $\text{C}_{20}$ , la colonne a été chauffée à 220° : le temps de rétention du palmitate de méthyle est alors d'environ quinze minutes. Dans le cas des esters d'acides de  $\text{C}_4$  à  $\text{C}_{10}$ , la colonne a été chauffée à 145°, et dans le cas des diesters de diacides de  $\text{C}_4$  à  $\text{C}_{10}$ , à 165°. L'identification des esters a été réalisée par comparaison de leur temps de rétention avec celui d'un ester authentique (les mesures étant faites au cours d'une même série de chromatographies). Dans le cas d'ambiguïté, un témoin interne est ajouté au mélange à étudier. La détermination quantitative des esters a été effectuée par décalage des pics sur du papier millimétré et comptage des carrés. Des mesures effectuées avec des quantités connues d'esters montrent que ce procédé entraîne une erreur d'environ 10 p. 100, mais cette erreur est réduite à environ 5 p. 100 lorsqu'il ne s'agit que de déterminer les proportions relatives des divers constituants d'un mélange.

## RÉSULTATS.

*Corynebacterium diphtheriae*. — La composition du mélange d'acides gras présents dans les lipides du bacille diptérique montre quelques variations selon les auteurs. Asano et Takahashi [9] ont caractérisé les acides myristique, myristoléique, palmitique et palmitoléique. Pudles [10] a trouvé que les acides gras consistent essentiellement en acides palmitique et palmitoléique. Plus récemment, Pustovalov [11], utilisant la chromatographie sur papier, a décelé en outre les acides octadécanoïque et éicosénoïque.

Nous avons examiné les acides gras provenant de la saponification des lipides totaux. Le chromatogramme en phase gazeuse des esters méthyliques montre essentiellement trois pics, correspondant à des acides en C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> et C<sub>18</sub>. Après traitement des esters par le brome, le chromatogramme montre un pic pratiquement inchangé correspondant à l'acide en C<sub>14</sub>, un pic correspondant à l'acide en C<sub>16</sub> dont la surface est environ les deux tiers de celle du pic observé dans le premier chromatogramme, et la disparition presque totale du pic correspondant à l'acide en C<sub>18</sub>. Ces résultats mettent en évidence les acides myristique, palmitique, hexadécénoïque(s) et octadécénoïque(s) dans les proportions approximatives 1:180:75:50 (la précision de ces chiffres a été discutée ci-dessus). Aucun constituant en C<sub>20</sub> n'a été observé et aucun acide à nombre impair d'atomes de carbone n'est présent en quantité appréciable. L'acide hexadécénoïque est vraisemblablement de l'acide palmitoléique (voir [10]), et l'acide octadécénoïque est probablement identique à l'acide oléique que nous avons mis en évidence chez *C. ovis* (voir ci-dessous).

Les mêmes résultats ont été obtenus au cours de l'analyse des mélanges d'acides gras provenant de diverses fractions séparées par chromatographie sur alumine des lipides solubles dans l'acétone. D'autre part, nous avons isolé à partir des lipides insolubles dans l'acétone une fraction insoluble dans l'éther, F. 205-210°, qui consiste en sels de sodium du même mélange d'acides gras (voir tableau I). Rappelons que Macheboeuf et Cassagne [12] avaient observé la présence chez *C. diphtheriae* de palmitate de sodium.

*Corynebacterium ovis*. — Le chromatogramme fourni par le mélange d'esters préparé à partir des lipides totaux présente la même silhouette que celui qui est obtenu avec les esters de *C. diphtheriae*. Cependant, le traitement par le brome montre que l'acide hexadécénoïque est ici un constituant très peu impor-

tant du mélange (fig. 1). Les proportions relatives des acides myristique, palmitique, hexadécénoïque et octadécénoïque sont environ 1:260:20:70.

Le mélange des acides totaux a été oxydé par le permanganate de potassium en solution aqueuse diluée [13]. Le mélange d'acides dihydroxylés obtenu, F. 125-127°, présente une composition centésimale qui correspond à celle d'un acide  $C_{18}H_{36}O_4$  souillé de son homologue  $C_{16}H_{32}O_4$  (voir tableau I). Après oxydation de ce mélange par l'acide périodique [14], les aldéhydes formés ont

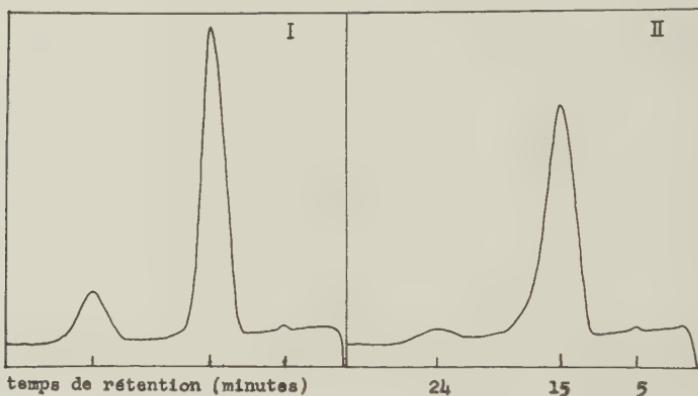


FIG. 1. — Chromatogramme en phase gazeuse des esters isolés de *C. ovis*, avant (courbe I) et après (courbe II) traitement par le brome.

été séparés par entraînement par la vapeur d'eau. La partie non volatile, oxydée par le permanganate de potassium en milieu acide, fournit, comme *seul constituant*, de l'*acide azélaïque* F. 103-104°, identifié par l'absence de dépression du point de fusion de son mélange avec de l'acide authentique, par sa composition centésimale (tableau I), et par la chromatographie en phase gazeuse de son diester méthylique. La partie volatile a été oxydée, et les acides formés ont été méthylés par le diazométhane : la chromatographie en phase gazeuse met en évidence comme constituant essentiel l'*acide nonanoïque*, accompagné d'un peu d'*acide heptanoïque*. Ces résultats montrent que la fraction d'acides insaturés de *C. ovis* est constituée principalement par de l'*acide octadécène-9 oïque*, accompagné d'un peu d'*acide hexadécène-9 oïque*. Ces deux acides sont les isomères *cis*, d'après l'absence de bande à  $10,35 \mu$  dans le spectre I. R. du mélange initial d'esters. Hilditch [15] donne F. 125-126° pour le

mélange d'acides dihydroxylés provenant de l'oxydation permanente d'un mélange (25/75) d'acides palmoléique et oléique.

En conclusion, les acides gras présents dans les lipides de *C. ovis* sont les acides myristique, palmitique, palmitoléique et oléique (avec peut-être des traces d'acide stéarique). L'absence d'acides normaux supérieurs résulte de la distillation du mélange brut d'esters : aucune fraction intermédiaire n'a été trouvée entre l'oléate de méthyle et le corynomycolate de méthyle.

TABLEAU I. — Composition centésimale d'acides gras (ou de leurs dérivés) et de leurs produits de dégradation (\*).

	TROUVÉ %			CALCULÉ %			
	C	H	(C) CH <sub>3</sub>	formule brute	C	H	(C) CH <sub>3</sub>
Sel de sodium isolé de <i>C. diphtheriae</i> .....	68,6	10,9		C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> Na	69,0	11,2	
Acide dihydroxylé F 127°, provenant de <i>C. ovis</i> .....	68,14	11,27		C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub> C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	68,31 66,63	11,47 11,27	
Diacide F 104°, provenant de la coupure de l'acide dihydroxylé F 127° .....	57,38	8,52		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	57,43	8,57	
Fraction d'esters non incluse par l'urée de <i>P. pestis</i> ....	76,82	12,15	5,50	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	76,54	12,13	5,32
<i>n</i> -heptadécanoate de méthyle provenant de l'hydrogénéation de l'acide C <sub>17</sub> de <i>P. pestis</i>	76,25	12,55		C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	75,98	12,75	

(\*) Analyses effectuées par le laboratoire de micro-analyse de la CIBA (Bâle).

*Pasteurella pestis*. — La préparation de graisses dont nous avons disposé, était constituée par un mélange d'acides gras libres et de glycérides, d'après le titrage et la mise en évidence de glycérol (par chromatographie sur papier) dans la fraction hydrosoluble de saponification.

Les acides gras, isolés après saponification, ont été méthylés par le diazométhane, chromatographiés sur alumine, et distillés. Ces opérations permettent d'exclure la présence, en quantité appréciable, d'acides hydroxylés, ou d'acides ayant plus de 20 atomes de carbone (1). La chromatographie en phase gazeuse

(1) Des acides à très haut poids moléculaire peuvent éventuellement exister dans la fraction insaponifiable.

(fig. 2, partie I) montre la présence d'acides à chaîne normale en  $C_{16}$  et  $C_{18}$ , et d'acides à chaîne ramifiée en  $C_{17}$  et  $C_{19}$ . Les temps de rétention de ces deux derniers acides ne sont que légèrement inférieurs à ceux des acides à chaîne normale correspondants. Des traces d'acides en  $C_{14}$  et  $C_{15}$  peuvent aussi être observées. Le traitement du mélange d'esters par le brome entraîne la disparition presque complète du pic correspondant à l'ester d'acide en  $C_{18}$ .

Le mélange d'esters a été fractionné par deux traitements par l'urée [16]. A partir des cristaux d'inclusion, nous avons isolé les esters d'acides palmitique, octadécenoïque, accompagnés d'un

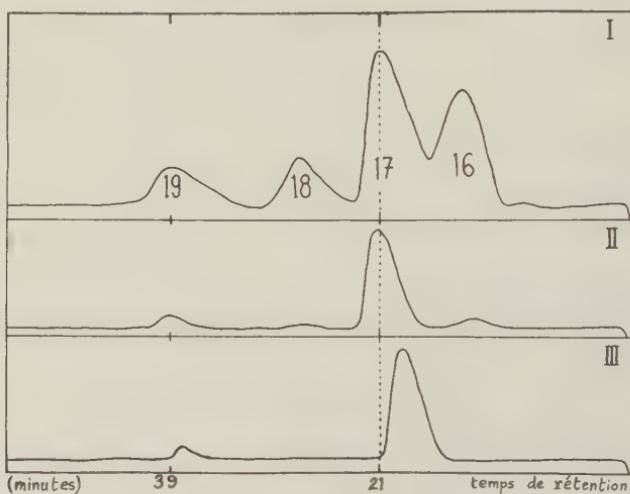
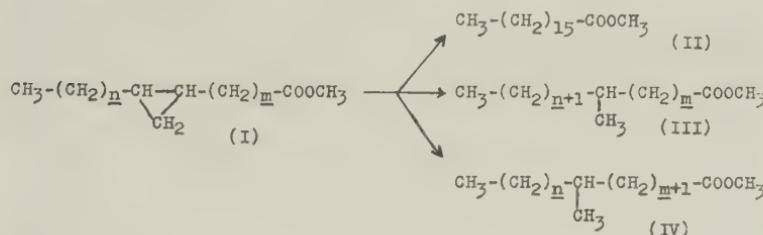


FIG. 2. — Chromatographie en phase gazeuse des esters isolés de *P. pestis* (courbe I), de la fraction non incluse par l'urée (courbe II), et de la fraction non incluse par l'urée des esters hydrogénés (courbe III); la ligne pointillée montre la position de l'ester d'acide  $C_{17}$  à cycle propanique.

peu d'ester d'acide en  $C_{19}$ . La partie non incluse par l'urée fournit un chromatogramme en phase gazeuse représenté sur la figure 2, partie II : le constituant principal est l'ester d'acide en  $C_{17}$ , à chaîne ramifiée, accompagné d'un peu d'ester d'acide en  $C_{19}$  (et un peu d'esters d'acides en  $C_{16}$  et  $C_{18}$  qui ont échappé à l'inclusion) (tableau I). Le spectre infrarouge de cette fraction montre une bande relativement forte à  $9,8 \mu$ , pouvant être attribuée à un cycle propanique [17]. Après hydrogénéation catalytique de cette fraction (dans les conditions permettant l'ouverture d'un cycle propanique [17]), les esters hydrogénés ont été soumis à

un nouveau fractionnement par l'urée. La fraction hydrogénée non incluse fournit le chromatogramme en phase gazeuse représenté sur la figure 2, partie III ; le pic principal correspond à l'ester d'un acide en C<sub>17</sub> dont le temps de rétention est nettement inférieur à celui de l'ester avant l'hydrogénéation. Ceci s'explique par la transformation d'un ester tel que (I) en un mélange d'esters (III) et (IV) [le fractionnement par l'urée ayant éliminé le *n*-heptadécanoate de méthyle (II)].



Le comportement de ces esters en chromatographie en phase gazeuse peut se rapprocher de celui du lactobacillate de méthyle (méthylène-11, 12 octadécanoate de méthyle) et du tuberculostéarate de méthyle (méthyl-10 octadécanoate de méthyle) : le tuberculostéarate montre un temps de rétention nettement inférieur à celui du lactobacillate, qui a lui-même un temps de rétention très peu inférieur à celui du *n*-nonadécanoate de méthyle [3].

La chromatographie en phase gazeuse des esters hydrogénés inclus par l'urée montre la présence de *n*-heptadécanoate de méthyle (II), et d'un peu d'ester d'acide en C<sub>19</sub>, dont le temps de rétention reste un peu inférieur à celui du *n*-nonadécanoate de méthyle. D'autre part, la chromatographie en phase gazeuse de la fraction d'esters non inclus par l'urée et non hydrogénée, additionnée d'ester d'acide en C<sub>17</sub>, contenant un cycle propanique provenant des lipides d'*Escherichia coli* [4], montre l'identité de comportement chromatographique de ces deux esters d'acides en C<sub>17</sub>.

Ces résultats établissent l'existence dans les lipides de *P. pestis* d'un acide en C<sub>17</sub> contenant un cycle propanique. Ajoutons encore que les esters non inclus par l'urée (et non hydrogénés) ne possèdent pas d'absorption U. V. notable dans la région 213-220 m $\mu$ , ce qui exclut la conjugaison du cycle propanique avec le carboxyle. Le dosage de C-méthyle sur cette même fraction (tableau I) semble exclure la position du cycle propanique à l'extrémité terminale de la chaîne de l'ester. Enfin, cette fraction ne possède aucun pouvoir rotatoire mesurable, de même que le lactobacillate de méthyle, ou l'ester d'acide C<sub>17</sub> à cycle propanique de *E. coli*.

*En résumé*, les graisses de *P. pestis* contiennent les acides palmitique, octadécenoïque(s), et un ester d'acide en  $C_{17}$  contenant un cycle propanique (I) [qui peut être identique à celui d'*E. coli*] ; aucune conclusion ne peut être tirée en ce qui concerne l'ester d'acide en  $C_{19}$  : il pourrait consister en un mélange de *n*-nonadécanoate de méthyle et d'un ester semblable (ou identique) au lactobacillate de méthyle.

*Bacillus subtilis*. — Les acides gras des lipides de *B. subtilis* ont été récemment examinés par chromatographie de partage à phases inversées par Akashi et Saito [18], qui ont mis en évidence les acides myristique, palmitique, un acide en  $C_{15}$  (acide

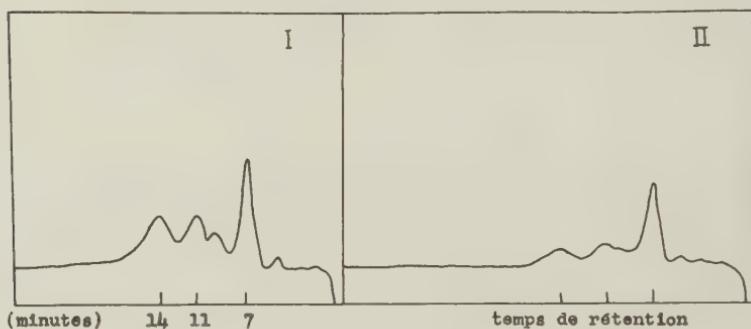


Fig. 3. — Chromatographie en phase gazeuse des esters isolés de *B. subtilis*, avant (courbe I) et après (courbe II) traitement par le brome.

sarcinique) et un acide en  $C_{17}$ . L'acide sarcinique est l'acide le plus important du mélange.

Ayant eu à notre disposition un échantillon d'acides gras provenant de la saponification des lipides totaux de *B. subtilis*, aimablement fournis par M<sup>me</sup> S. Dauchy (Nancy), nous avons soumis les esters méthyliques à la chromatographie en phase gazeuse. Le chromatogramme obtenu est représenté sur la figure 3, partie I. Les pics observés correspondent aux esters d'acides en  $C_{14}$ ,  $C_{15}$  à chaîne ramifiée,  $C_{16}$  à chaîne ramifiée,  $C_{16}$  normal et  $C_{17}$  vraisemblablement ramifié. Le traitement de ces esters par le brome ne fait disparaître aucun d'entre eux. Ces résultats confirment ceux des auteurs japonais et montrent l'existence d'un acide supplémentaire.

Il doit être noté que le pic correspondant à l'ester d'acide en  $C_{17}$  présente un temps de rétention peu inférieur à celui du *n*-heptadécanoate de méthyle, et que le spectre I. R. du mélange total d'esters montre une bande nette, quoique faible, à 9,8  $\mu$ .

Ces observations pourraient correspondre à l'identité de cet acide  $C_{17}$  aux acides  $C_{17}$  à cycle propanique de *P. pestis* ou *E. coli*. Faute d'une quantité suffisante de matériel, nous n'avons pu poursuivre cet examen.

#### CONCLUSIONS.

Cette étude a tout d'abord permis de préciser la nature des acides gras présents dans les lipides de plusieurs espèces bactériennes. L'existence d'un acide (en  $C_{17}$ ) contenant un cycle propanique a été démontrée chez *P. pestis* et rendue probable chez *B. subtilis*. Rappelons qu'un acide semblable (ou identique) a été

TABLEAU II. — Composition des mélanges d'acides gras isolés de plusieurs espèces bactériennes.

ACIDES	CORYNEBACTERIUM		PASTEU- RELLA PESTIS	BACILLUS SUBTILIS	ESCHE- RICHIA COLI	MYCOBAC- TERIUM PHLEI
	DIPHTHERIÆ	OVIS				
Myristique ....	+	+	±	+	++	++
$C_{15}$ ramifié ....				+++++		
$C_{16}$ ramifié ....				++		
Palmitique ....	+++++	++++	++++	++	++++	+++++
H e x a d é c é - n o i q u e ....	++	±			±	
$C_{17}$ , à cycle pro- panique ....			+++++	++	+++	
Stéarique ....					++	+++
Octadécénoïque.	+++	+++	++			++
$C_{18}$ ramifié I*. .						++
$C_{18}$ ramifié II*. .			++			++
Acides non rami- fiés supérieurs .						+++
Références ....	présent travail			[4]	[21]	

(\*) L'ester de l'acide ramifié I (tuberculostéarate de méthyle) présente un temps de rétention plus faible que celui de l'acide ramifié II.

caractérisé dans les lipides d'*E. coli* [4], et que l'acide lactobacillique (acide en  $C_{19}$ , à cycle propanique) a été isolé de plusieurs espèces de *Lactobacillus* [17, 19] et d'*Agrobacterium phytomonas* [20]. La présence d'acides gras (en  $C_{17}$  ou  $C_{19}$ ) contenant un cycle propanique est donc relativement fréquente chez les bactéries.

D'autre part, si l'on considère les chromatogrammes en phase gazeuse des mélanges d'esters obtenus à partir des lipides de

*C. ovis*, *P. pestis* et *B. subtilis* (fig. 1, 2 et 3), on constate des différences importantes dans la silhouette des courbes obtenues : chaque genre bactérien présente une courbe caractéristique. À l'intérieur d'un même genre (*C. diphtheriae* et *C. ovis*), les différences sont très faibles. Dans le tableau II, nous avons rassemblé ces observations, en y ajoutant les résultats concernant *Escherichia coli* [4] et *Mycobacterium phlei* [24]. Quoique ces données soient limitées à un nombre trop restreint de cas, elles montrent que ce mode d'analyse pourrait éventuellement apporter une aide efficace au microbiologiste pour la classification d'espèces bactériennes mal définies. Certains appareils de chromatographie en phase gazeuse, suffisamment sensibles pour n'utiliser que des fractions de milligramme de substance, peuvent permettre de réduire la quantité de matériel bacillaire nécessaire à des valeurs relativement petites (moins de 1 g de bacilles humides).

#### RÉSUMÉ.

La nature des acides gras présents dans quatre souches bactériennes a été étudiée, principalement par chromatographie en phase gazeuse. *C. diphtheriae* et *C. ovis* contiennent les acides myristique, palmitique, palmitoléique et oléique ; *P. pestis* renferme les acides palmitique, octadécenoïque, un acide en  $C_{17}$  à cycle propanique et un acide en  $C_{19}$  non identifié ; *B. subtilis* contient des acides en  $C_{14}$ ,  $C_{15}$  à chaîne ramifiée,  $C_{16}$  normal et à chaîne ramifiée, et  $C_{17}$ .

Les possibilités d'emploi de cette technique analytique pour l'identification du genre auquel appartient une souche bactérienne sont soulignées.

#### SUMMARY

##### SOME APPLICATIONS OF GAS CHROMATOGRAPHY TO THE STUDY OF BACTERIAL FATTY ACIDS.

The nature of the fatty acids of four bacterial strains is studied by different chromatographic methods, particularly gas chromatography.

*C. diphtheriae* and *C. ovis* contain myristic, palmitic, palmitoleic and oleic acids. *P. pestis* contains palmitic, octadecenoic acids, a  $C_{17}$  acid with a propanic ring, and a non identified  $C_{19}$  acid. *B. subtilis* contains the following acids :  $C_{14}$ , branched  $C_{15}$ , normal  $C_{16}$ , branched  $C_{16}$ , and  $C_{17}$ .

The application of this analytic technique to the identification of the genus of a bacterial strain is proposed.



Nous remercions M. le Professeur Tréfouël et M. le Dr Lafay, qui nous ont fourni des lots de bactérie diptérique ; le Dr Carne, de *C. ovis* ; le Dr Davies, des lipides de *P. pestis*, et M<sup>me</sup> Dauchy, des acides gras de *B. subtilis*. Nous remercions en outre M. le Professeur E. Lederer de l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.

#### BIBLIOGRAPHIE.

- [1] JAMES (A. T.) et MARTIN (A. J. P.). *Biochem. J.*, 1956, **63**, 144.
- [2] AGRE (C. L.) et CASON (J.). *J. biol. Chem.*, 1959, **234**, 2555.
- [3] LABARRÈRE (J.) et ASSELINEAU (J.) [Résultats inédits].
- [4] DAUCHY (S.) et ASSELINEAU (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 2635.
- [5] ASSELINEAU (C.), ASSELINEAU (J.), RYHAGE (R.), STALLBERG-STENHAGEN (S.) et STENHAGEN (E.). *Acta Chem. scand.*, 1959, **13**, 822.
- [6] ASSELINEAU (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1956, **38**, 1397.
- [7] GORDON (H. T.), THORNBURG (W.) et WERUM (L. N.). *Anal. Chem.* 1956, **28**, 849.
- [8] CASON (J.) et TAVS (P.). *J. biol. Chem.*, 1959, **234**, 1401.
- [9] ASANO (M.) et TAKAHASHI (H.). *J. pharm. Soc. Japan* 1945, **65**, 17.
- [10] PUDLES (J.). Thèse doctorat d'Université, Paris, 1954.
- [11] PUSTOVALOV (V. L.). *Biokhimiya*, 1956, **21**, 38.
- [12] MACHEBOEUF (M.) et CASSAGNE (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **200**, 1988.
- [13] GUNSTONE (F. D.). *Adv. org. Chem.*, 1960, **1**, 103.
- [14] HUBER (W. F.). *J. am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 2730.
- [15] HILDITCH (T. P.). *J. Chem. Soc.*, 1926, 1828.
- [16] TRUTER (E. V.). *J. Chem. Soc.*, 1951, 2416.
- [17] HOFMANN (K.), LUCAS (R. A.) et SAX (S. M.). *J. biol. Chem.*, 1952, **195**, 473.
- [18] AKASHI (S.) et SAITO (K.). *J. Biochem. Japan*, 1960, **47**, 222..
- [19] HÖFmann (K.). *Record Chem. Progr.*, 1953, **14**, 7.
- [20] HOFMANN (K.) et TAUSIG (F.). *J. biol. Chem.*, 1955, **213**, 425.
- [21] TOUBIANA (R.) et ASSELINEAU (J.) [Résultats inédits].



## **CONTROL OF VI-PHAGE TYPE OF *SALMONELLA TYPHI* BY POLYLYSOGENICITY (\*)**

by K. S. READ and W. W. FERGUSON (\*\*).

(*Division of Laboratories, Michigan Department of Health  
Lansing, Michigan, U. S. A.*)

The investigations of Anderson and Felix (1953), and Ferguson, Juenker, and Ferguson (1955) have demonstrated that lysogenicity with type determining phages controls the Vi-phage sensitivity of many of the Vi types of *Salmonella typhi*. Observations to date have been concerned with singly lysogenic cultures. Each of the latter bears a single temperate phage which is capable of bringing about a conversion of Vi type when applied to the proper receptor culture. Double lysogenicity by type determining phages has been suspected, as in the case of type D<sub>6</sub> (Anderson and Felix, 1953), but has not been proven. In the present paper double lysogenicity is reported for Vi types D<sub>8</sub>, D<sub>9</sub> and D<sub>10</sub>. Each carries two temperate phages which are responsible for the Vi-phage sensitivities of the culture.

Discovery of the polylysogenic state of types D<sub>8</sub>, D<sub>9</sub> and D<sub>10</sub> was made during a study of Vi types D<sub>1</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>7</sub>, D<sub>8</sub>, D<sub>9</sub> and D<sub>10</sub>. When type A (Felix) culture was used as an indicator, Vi types D<sub>1</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>7</sub>, D<sub>8</sub>, D<sub>9</sub> and D<sub>10</sub> were found to yield temperate phages which were subsequently shown to have a common characteristic. Temperate phages d<sub>1</sub>, d<sub>4</sub>, d<sub>7</sub>, d<sub>8</sub>, d<sub>9</sub> and d<sub>10</sub> had the ability, when applied to type A culture, of converting the Vi-phage type to type D<sub>1</sub>. Since the temperate phages listed have the same type converting ability, and the parent cultures from which they are derived are different in Vi-phage sensitivity, it seemed plausible that the non-lysogenic precursor cultures of types D<sub>1</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>7</sub>, D<sub>8</sub>, D<sub>9</sub> and D<sub>10</sub> are different. An indirect attempt at determining this difference was made with nine subtype A cultures of Nicolle,

(\*) This investigation was supported in part by Grant E 1113 from the Division of Research Grants, National Institutes of Health, Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Bethesda, Maryland, U. S. A.

(\*\*) Manuscrit reçu le 29 juillet 1960.

Pavlatou and Diverneau (1954), some of which are lysogenic with non-type determining phages, and some of which are not. When several of these prototype strains were treated with phage  $D_1$ , one lysogenic culture, subtype Leopoldville, became doubly lysogenic and nearly identical in Vi-phage pattern with natural type  $D_8$ . Conversely, lysogenization of type  $D_1$  with the phage obtained from the Leopoldville culture produced a doubly lysogenic culture very similar to type  $D_8$ . This led to examination of  $D$  type cultures for evidence of polylysogenicity.

#### METHODS AND MATERIALS.

Phage assay agar was veal infusion broth with 1.4 per cent Difco agar. Vi-phage types of *S. typhi* employed were standard cultures issued by the International Reference Laboratory for Vi-phage Typing, Central Public Health Laboratory, London, England, as were the Vi-phages used in typing. Types  $D_8$ ,  $D_9$  and  $D_{10}$  bore the reference numbers T6660, T6940 and T7047, respectively.

Spontaneous induction of temperate phages was accomplished by rapid growth of lysogenic cultures in 50 ml of veal infusion broth in 250 ml flasks. Incubation was at 37° C and growth of approximately  $5 \times 10^8$  ml of cells was attained on a rotary shaker, before harvest. Cells were separated after growth by centrifugation. Supernatant fluid was filtered through a membrane filter. Assay of phages was carried out on young broth cultures of either type A [Felix] (1) or type  $D_1$  after methods previously described (Ferguson, Juenker and Ferguson, 1955). Purification of induced phages was done by repeated cycles of single plaque selection and propagation. For lysogenization an undiluted filtrate of temperate phage was applied on a young broth culture of type A which had been flooded and dried on agar plates. Resistant growth which developed in the lytic areas was streaked on agar plates. Single colonies from this subculture were tested for lysogeny by the cross-streak technique against the particular phage used in lysogenization.

When filtrates containing a mixture of  $\alpha$  and  $\beta$  phages were applied on type A culture, it was customary for plaques of  $\alpha$  phage to develop in 3 to 4 hours at 37° C.  $\beta$  phage plaques, in contrast, did not become clearly defined until 5-6 hours had elapsed. Incubation, therefore, was uniformly carried out for 6 hours when observing development of « d » series phages.

(1) Unless otherwise specified *S. typhi* type A, Felix strain, was used in experimental work. This is a non-lysogenic strain similar to the Tananarive subtype of Nicolle.

## RESULTS.

TYPE D<sub>s</sub>. — After growth of type D<sub>s</sub> culture in shaken flasks the filtrate was placed on type A seeded plates. It was noted that two types of plaques resulted, one semi-turbid and the other turbid. Single plaques of both plaque types were propagated separately on type A, and host range determinations made. It was found that the semi-turbid plaque type, termed phage d<sub>s</sub> α for convenience, was identical in host range with temperate phage d<sub>1</sub> and had the same type converting ability (type A to type D<sub>1</sub>). The turbid plaque type, termed phage d<sub>s</sub> β, had a somewhat different host range from d<sub>s</sub> α phage, notably the ability to lyse type D<sub>1</sub> culture. Of greatest interest was the fact that type D<sub>1</sub> when lysogenized with phage d<sub>s</sub> β was transformed into type D<sub>s</sub>. No change occurred when phage d<sub>s</sub> β was applied to type A. As the host range activity indicated, type D<sub>1</sub> culture was resistant to d<sub>s</sub> α phage. It appeared, therefore, that a dual phage system controlled the Vi-phage specificity of type D<sub>s</sub>, i. e., type A culture lysogenized with d<sub>s</sub> α phage became type D<sub>1</sub>, and type D<sub>1</sub> treated with d<sub>s</sub> β phage became type D<sub>s</sub>.

If one follows the system established by Anderson and Fraser (1955), the structural formula of type D<sub>s</sub> culture will be A (d<sub>s</sub> α, d<sub>s</sub> β), from the fact that type A culture plus phage d<sub>s</sub> α, plus phage d<sub>s</sub> β, becomes type D<sub>s</sub> (table III).

TYPE D<sub>9</sub>. — Type D<sub>9</sub> was demonstrated to be doubly lysogenic by the same method used with type D<sub>s</sub>. Filtrate from rapid growth of type D<sub>9</sub> yielded semi-turbid and turbid plaques on type A cultures. The semi-turbid plaque type, termed d<sub>9</sub> α, was identical with d<sub>1</sub> and d<sub>s</sub> α phages in host range activity, moreover, it had the same type converting capacity, in that type A lysogenized with d<sub>9</sub> α phage became type D<sub>1</sub>. The d<sub>9</sub> α phage had no activity on type D<sub>1</sub>, as was to be expected. The turbid plaque type, termed d<sub>9</sub> β, had a limited host range activity and a minute plaque size. Type D<sub>1</sub> lysogenized with d<sub>9</sub> β phage was transformed into type D<sub>9</sub>. The structural formula for type D<sub>9</sub> may be written as A (d<sub>9</sub> α, d<sub>9</sub> β) [table III].

TYPE D<sub>10</sub>. — The filtrate of type D<sub>10</sub> produced three plaque types on type A culture : a semi-turbid plaque (d<sub>10</sub> α phage), a turbid plaque (d<sub>10</sub> β phage), and a clear plaque. The clear plaques are presumed to be mutants of d<sub>10</sub> β phage, although complete proof of this is lacking as yet. Phage d<sub>10</sub> α was found to be similar in host range to phages d<sub>s</sub> and d<sub>9</sub> α, also, it had the ability to

transform type A into type D<sub>1</sub>. The d<sub>10</sub> β phage was found to have a host range activity similar to d<sub>8</sub> β phage; indeed, it was found to convert type D<sub>1</sub> into type D<sub>8</sub> when the former culture was lysogenized with d<sub>10</sub> β agent. This demonstrated the simi-

TABLE I. — Host range activity of « d » series temperate phages upon lysogenic *Salmonella typhi* Vi-phages types.

Vi type cultures	Temperate phages						
	d <sub>1</sub>	d <sub>8</sub> α	d <sub>9</sub> α	d <sub>10</sub> α	d <sub>8</sub> β	d <sub>9</sub> β	d <sub>10</sub> β
B <sub>2</sub> -	—	—	—	—	—	—	—
B <sub>3</sub>	—	—	—	—	+	—	+
C <sub>2</sub> -33	+	+	+	+	+	—	+
C <sub>3</sub> -30	+	+	+	+	+	—	+
C <sub>8</sub>	+	+	+	+	+	—	+
C <sub>9</sub>	—	—	—	—	±	—	±
D <sub>1</sub>	—	—	—	—	+	+	+
D <sub>4</sub>	—	—	—	—	—	—	—
D <sub>6</sub>	+	+	+	+	+	+	+
E <sub>7</sub>	+	+	+	+	+	—	+
E <sub>8</sub>	+	+	+	+	+	—	+
E <sub>9</sub>	—	—	—	—	±	—	±
F <sub>2</sub>	—	—	—	—	±	—	±
J <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—	—
K	—	—	—	—	+	—	+
T	+	+	+	+	—	+	—
25	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	—	—	—
28	—	—	—	—	—	+	—
29	+	+	+	+	+	—	+

—, no reaction; ±, partial reaction; +, strong reaction.

larity of phages d<sub>8</sub> β and d<sub>10</sub> β but left unsolved the problem of the precursor culture of type D<sub>10</sub>.

The history of the prototype culture of type D<sub>10</sub> furnished a clue. It was found from data supplied through the courtesy of Miss Virginia Wilson of the National Reference Vi-Phage Typing Center, Communicable Disease Center, Chamblee, Georgia, that type D<sub>10</sub> had been isolated from a Michigan resident. This patient had originally excreted a typhoid organism phage typed as D<sub>7</sub>, but the same patient later was found to excrete a type which came to be known as D<sub>10</sub>. When type D<sub>7</sub> culture was lyso-

genized with  $d_{10}\beta$  phage, a culture resulted which was identical in Vi-phage type characteristics with natural type  $D_{10}$ . It would appear, therefore, that the precursor culture of type  $D_{10}$  is type  $D_7$ . At present the complete structural formula of type  $D_{10}$  is unknown, however, it can be tentatively expressed as  $A ? (d_{10}\alpha, d_{10}\beta)$ .

The problem of the structural formula of type  $D_7$  is still unsolved. The filtrate of type  $D_7$  yields a phage identical with  $d_1$ ,  $d_8\alpha$ ,  $d_9\alpha$  and  $d_{10}\alpha$  agents. Phage  $d_7$  transforms type A into type  $D_1$ . Obviously type  $D_7$  is either doubly lysogenic and its second phage undisclosed, or its non-lysogenic precursor is different from type A.

**IDENTITY OF TEMPERATE PHAGES OF TYPES  $D_8$ ,  $D_9$  AND  $D_{10}$ .** — A thorough study of the characteristics of the  $\alpha$  and  $\beta$  phages of types  $D_8$ ,  $D_9$  and  $D_{10}$  has not been made as yet, nor has a searching comparison been made with the numerous type determining and non-determining temperate phages of *S. typhi*. Nevertheless, certain tentative conclusions can be drawn from the available data. In tables I, II and III comparison is made

TABLE II. — Comparative plaque sizes\* of *Salmonella typhi* temperate phages of the « d » series.

$d_1$	.....	0.36 mm
$d_8\alpha$	.....	0.36 mm
$d_9\alpha$	.....	0.36 mm
$d_{10}\alpha$	.....	0.36 mm
$d_8\beta$	.....	0.28 mm
$d_9\beta$	.....	0.17 mm
$d_{10}\beta$	.....	0.28 mm

\* This is an expression of the average sizes of the larger plaques of each phage.

of host range activity, plaque size and type converting abilities, respectively, of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $d_1$  phages. It will be noted that host range activity of  $d_8$ ,  $d_9$ , and  $d_{10}\alpha$  phages is identical with that of phage  $d_1$ , an agent that was first isolated by Craigie (1946). In addition the plaque sizes of the four phages are similar and their type converting ability is the same. There seems little doubt that these are identical phages and may be labelled as phage  $d_1$ , according to the system devised by Anderson and Fraser (1955).

The  $\beta$  phages  $d_8$  and  $d_{10}$  are similar in host range activity and plaque size. Neither phage has type transforming ability when applied to type A culture. It will be seen from table III that both will transform type  $D_1$  into type  $D_8$ . Whether these are one and the same phage remains to be determined. Phage  $d_9 \beta$  obviously stands alone. Its host range activity differs from that

TABLE III. — Type determining phages of Vi types of *Salmonella typhi* and their type transforming capacities.

Vi-phage type	Vi-phage type Structural formula*	Phage	Type transformation	Phage	Type transformation
$D_1$	A ( $d_1$ )	$d_1$	A $\rightarrow D_1$		
$D_8$	A ( $d_8\alpha + d_8\beta$ )	$d_8\alpha$	A $\rightarrow D_1$	$d_8\beta$	$D_1 \rightarrow D_8$
$D_9$	A ( $d_9\alpha + d_9\beta$ )	$d_9\alpha$	A $\rightarrow D_1$	$d_9\beta$	$D_1 \rightarrow D_9$
$D_{10}$	A? ( $d_{10}\alpha + d_{10}\beta$ )	$d_{10}\alpha$	A $\rightarrow D_1$	$d_{10}\beta$	$D_1 \rightarrow D_8$ $D_7 \rightarrow D_{10}$

\* Precursor culture together with type determining phages.

of the other two  $\beta$  phages, as well as the host range activity of the  $\alpha$  phages; its plaque size is smaller than any of the  $d$  phages considered in this study; its type transforming ability sets it apart. Preliminary observations suggest that the  $\beta$  phages, whether two or three in number, are different from any of the temperate phages of *S. typhi* previously reported (Anderson and Felix, 1953; Ferguson, Juenker and Ferguson, 1955).

#### DISCUSSION.

Anderson (1959) has listed, but has not discussed, the type determining phages of types  $D_8$ ,  $D_9$ , and  $D_{10}$  as follows: type  $D_8$ , phage  $d_8$ ; types  $D_9$  and  $D_{10}$ , phage  $d_9$ . Since this is at variance with our observations, the work reported here has been carefully repeated. Results were verified in the case of each type and each phage. A possible explanation of Anderson's results would be the preliminary examination of filtrates with inadvertant use of mixtures of  $\alpha$  and  $\beta$  agents. Even with apparent single plaque selection the possibility of a mixture is considerable, particularly if type A was used as the sole indicator culture. In our experience it was the activity of turbid plaque  $\beta$  phages on type  $D_1$ , and lack of activity of semi-turbid plaque  $\alpha$  phages on this culture which suggested multiple lysogenicity.

The observations reported in this paper are reminiscent of the

work of Nicolle and colleagues (1951), who were the first to express the concept of type determining phages (phages déterminants). This resulted from their studies on lysogenicity of the various phage types of *Salmonella paratyphi* B in the system of Felix and Callow. It was established by Nicolle and coll. that a type determining phage may occur in combination with a non-type determining phage (phage indifférent) on a single strain of *S. paratyphi* B, or, on occasion, two phages may be type determining for a single strain of this organism. The temperate phage combinations found by Nicolle and co-workers suggest that polylysogenicity among the phage types of *S. paratyphi* B is a more elaborate system than that found to date on Vi phage types of *S. typhi*.

### SUMMARY

Polylysogenicity has been demonstrated in Vi-phage types D<sub>8</sub>, D<sub>9</sub>, and D<sub>10</sub> of *Salmonella typhi*. Each Vi type bears two temperate phages which are both essential in determining the Vi-phage sensitivity of the culture. These are the first instances reported in which more than a single type determining phage has been found in a single Vi type of *S. typhi*. The host range activities, plaque sizes, and type converting abilities of the six temperate phages are described.

### RÉSUMÉ.

#### RÉACTIONS LYSOTYPIQUES CARACTÉRISTIQUES DE CERTAINS LYSOTYPES VI DE *Salmonella typhi* DÉTERMINÉES PAR DES LYSOGÉNÉITÉS MULTIPLES.

Les auteurs démontrent que les lysotypes Vi D<sub>8</sub>, D<sub>9</sub> et D<sub>10</sub> de *S. typhi* sont doués d'une lysogénéité multiple. Chacun d'eux élabore deux phages tempérés qui sont l'un et l'autre nécessaires pour leur conférer leurs réactions lysotypiques caractéristiques. Ce sont les premiers exemples pour lesquels on a trouvé qu'un lysotype Vi donné de *S. typhi* élaborait plus d'un phage déterminant. Les spectres d'activité, les dimensions des plages et les propriétés transformatrices des six phages tempérés sont décrits.



### ACKNOWLEDGEMENT.

We wish to thank Dr. P. R. Edwards of the National Reference Center, Communicable Disease Center, Chamblee, Georgia, U. S. A. for supplying newly recognized Vi types, together with

Vi typing phages. We also wish to express our thanks for the generosity of Dr. Pierre Nicolle, Pasteur Institute, Paris, France, for providing cultures of his complementary divisions of type A, as well as specific phages.

## REFERENCES

ANDERSON (E. S.) and FELIX (A.). *J. gen. Microbiol.*, 1953, **9**, 65.  
FERGUSON (W. W.), JUNCKER (A.) and FERGUSON (R. A.). *Amer. J. Hyg.*, 1955, **62**, 306.  
NICOLLE (P.), PAVLATOU (M.) and DIVERNEAU (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 493.  
CRAIGIE (J.). *Bacteriol. Rev.* 1946, **10**, 73.  
ANDERSON (E. S.). *Nature*, 1959, **184**, 1822.  
ANDERSON (E. S.) and FRASER (A.). *J. gen. Microbiol.*, 1955, **13**, 519.  
NICOLLE (P.) and HAMON (Y.). *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 898.  
NICOLLE (P.), HAMON (Y.) and EDLINGER (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 479.  
HAMON (Y.) and NICOLLE (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 496.  
NICOLLE (P.) and HAMON (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 614.

---

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>)

Séance du 3 novembre 1960.

Présidence de M. REILLY.

---

## NÉCROLOGIE

### CHARLES OBERLING

(1895-1960)

La récente disparition du professeur Charles Oberling a privé la science française d'un maître éminent dont les travaux comme le rayonnement à l'étranger ont grandement contribué au prestige national.

Charles Oberling, fils d'un fonctionnaire modeste, était un enfant de la Lorraine. Né à Metz, alors annexée, il dut faire en langue allemande ses études secondaires avant de commencer sa médecine en 1919 à la Faculté de Strasbourg libérée. De cette formation bilingue il avait gardé, avec une culture étendue et des dons de polyglotte, une teinte d'accent qui s'ajoutait à des intonations spécifiquement lorraines : d'où l'étonnement qu'éprouvaient parfois certains, en écoutant ses leçons ou en lisant ses œuvres, à découvrir en lui un parfait styliste maîtrisant de façon incomparable les subtilités de la langue française.

A Strasbourg, Charles Oberling devait être simultanément l'élève de Pierre Masson, titulaire de la Chaire d'Anatomie pathologique, et d'Amédée Borrel qui avait celle de Bactériologie et d'Hygiène. Ces maîtres déjà illustres avaient tous deux, en 1918, quitté l'Institut Pasteur pour aller enseigner à Strasbourg dans la Faculté de Médecine rénovée ; tous deux devaient avoir sur Oberling une profonde influence en l'imprégnant des doctrines pasteurriennes et en l'attirant vers le problème du cancer par la double voie de la cytologie pathologique et de l'expérimentation microbiologique. C'est par l'anatomie pathologique que Ch. Oberling, bien que contraint par la nécessité matérielle à l'exercice de la médecine, aborda la carrière scientifique. En 1926, alors chef de travaux pratiques de Pierre Masson, il vint à Paris passer le concours d'agrégation, section d'histologie et d'embryologie, où il fut brillamment reçu, ce qui lui valut d'entrer à la Faculté de Médecine de Paris comme professeur agrégé de la Chaire d'Anatomie pathologique magistralement tenue par Gustave Roussy.

De cette période datent les importantes recherches d'anatomie pathologique portant notamment sur la neuropathologie et l'étude des tumeurs des centres nerveux publiées avec G. Roussy ; mais surtout il trouvait un laboratoire personnel à l'Institut du Cancer que Roussy venait de créer à Villejuif, et où, s'associant pendant de longues années en des travaux avec Maurice Guérin, Oberling poursuivit l'étude expérimentale du cancer chez l'animal. D'où les recherches aujourd'hui classiques d'Oberling et Guérin sur les leucoses aviaires, sur les tumeurs extravasculaires des érythroleucoses et leurs rapports avec le sarcome de Rous. C'est au cours de ces travaux que Charles Oberling sera progressivement gagné à l'idée de l'étiologie virale du cancer qui deviendra le principal sujet de ses recherches au cours de la dernière période de sa vie.

A la mort de Borrel, en 1936, Charles Oberling quitte Villejuif pour prendre à Strasbourg la tête de l'important Institut de Bactériologie qu'y avait progressivement édifié Borrel, ce qui lui est l'occasion, sans abandonner l'anatomie pathologique ni l'étude expérimentale du cancer, de se livrer à des incursions dans le domaine de la bactériologie et de l'hygiène. Survint la deuxième guerre mondiale et le repliement de la Faculté de Strasbourg sur Clermont-Ferrand : Charles Oberling se vit confier une mission en Iran. Chargé de réorganiser la Faculté de Médecine de Téhéran, il en a été nommé doyen, fonction qu'il occupera, sauf un court intermède, jusqu'en 1947. Cette année, j'étais moi-même à Téhéran lorsqu'y parvint la nouvelle inattendue de la mort d'Oberling ; je pus alors constater combien son souvenir y était demeuré vivant et quelle reconnaissante vénération s'attachait à sa mémoire.

En 1948, Oberling rentrait à Paris pour prendre la direction de l'Institut des Recherches du Cancer, devenu Institut Gustave-Roussy, qu'il ne devait plus quitter. La Faculté de Médecine créait pour lui en 1949 la Chaire de Carcinologie qu'il abandonna en 1954 pour la Chaire de Médecine expérimentale du Collège de France ; en 1956, Oberling était élu à l'Académie de Médecine dans la section des sciences biologiques.

L'œuvre de Charles Oberling est immense. Mais elle a très largement dépassé le cadre des publications scientifiques qu'il a consacrées aux différents sujets abordés durant une longue et active carrière. Il avait groupé autour de lui, à l'Institut du Cancer, une équipe de nombreux chercheurs, dotés des moyens de recherche des plus modernes, et il était devenu un véritable chef d'école. Son enseignement universitaire était prolongé par des ouvrages d'une tenue scientifique élevée qui, par la clarté de leur rédaction, atteignaient un public débordant le monde des spécialistes. Un premier livre de haute vulgarisation, *The Cancer Riddle*, écrit en 1942 lors d'un séjour au Canada et aux Etats-Unis avait connu un vif succès et avait été traduit en plusieurs langues. Une nouvelle version développée, publiée en français en 1954 sous le titre *Le Cancer*, a reçu à son tour une grande diffusion. Oberling s'y faisait le champion de la théorie infectieuse du cancer. S'appuyant sur ses travaux personnels autant que sur les acquisitions des dernières décades, il avait généralisé à toutes les tumeurs malignes les déductions tirées de l'étude des cancers à virus des animaux. Les études

poursuivies à l'aide du microscope électronique et avec la collaboration de W. Bernhard et F. Haguenau lui avaient permis de retrouver dans nombre de tumeurs des formations dont la morphologie est celle des virus. Chaque jour, chaque expérience apportait sa pierre à l'édification de la théorie virale du cancer. Ainsi reprenait-il sous une forme adaptée à nos connaissances actuelles l'idée du cancer, maladie transmissible, que son maître Borrel avait défendue jusqu'à sa mort.

Par l'autorité qui s'attachait à sa personne et à ses travaux, par ses dons d'enseigneur et par son tempérament de lutteur, Charles Oberling s'était imposé comme une grande figure de la carcinologie française. Sa disparition laisse un vide qu'il sera difficile de combler.

P. LÉPINE.

---

### PRÉSENTATION D'OUVRAGE

M. Lépine : Il n'existe pas jusqu'ici, en langue française, d'ouvrage d'ensemble traitant les maladies à virus des végétaux, et les chercheurs comme les spécialistes qui désiraient recourir à une documentation de première main ne pouvaient que s'adresser soit à des mises au point disséminées en diverses revues spécialisées, soit aux grands traités parus à l'étranger. Pourtant, la part croissante que prennent en pathologie végétale les maladies à virus, l'importance économique majeure que présente le diagnostic comme le traitement de ces affections chez les plantes cultivées justifiaient largement un ouvrage français. C'est dire à quel point vient à son heure le livre de M. Pierre Cornuet (1).

Présenté sous une forme facile à consulter et abondamment illustré, cet ouvrage comporte deux parties. La première, la plus importante, décrit les maladies à virus en suivant l'ordre botanique des plantes susceptibles d'être affectées ; la seconde donne succinctement les propriétés intrinsèques des virus classés par ordre alphabétique. L'accent a été placé bien entendu sur les virus existant en France ou susceptibles de s'y trouver en raison de leur présence dans d'autres pays d'Europe. Ces virus sont désignés par leur nom commun français, mais on trouve leur synonyme anglais dans la deuxième partie de l'ouvrage, ce qui facilitera les recherches bibliographiques. Les virus qui jusqu'ici n'ont pas été décrits en Europe sont désignés par leur nom commun anglais. Ainsi, en partant de l'espèce végétale atteinte on peut facilement retrouver la description des lésions et identifier un virus. On sait, en effet, combien les recherches bibliographiques, ou l'interprétation des descriptions données, sont compliquées par une abondante synonymie qui aurait rendu le seul classement par virus à peu près inintelligible pour le non-spécialiste.

(1) P. Cornuet : *Maladies à virus des plantes cultivées et méthodes de lutte*. Préface de P. Limasset. 1 vol., 144 p., Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1959.

Conçu sous une forme éminemment pratique, il est bien évident que l'ouvrage de P. Cornuet s'adresse avant tout à nos collègues botanistes. Mais il intéressera au même titre tous les laboratoires de virologie et tous ceux qui voudront avoir sur l'important groupe des virus des végétaux autre chose que les notions élémentaires que l'on trouve dans la plupart des traités de virologie ; aussi ce livre aura sa place dans toutes les bibliothèques de virologie.

Une abondante iconographie, reproduisant les lésions macroscopiques des plantes atteintes ou les documents de microscopie électronique précisant la morphologie des virus, ajoute à l'intérêt de l'ouvrage et à lagrément de la lecture. A la fin de chaque chapitre, une documentation bibliographique permet de remonter facilement aux sources.

Il n'existe pas actuellement dans la littérature étrangère, pas plus que dans la littérature française, de livre qui offre sous une forme à la fois aussi complète, aussi claire et aussi condensée l'essentiel de nos connaissances sur les maladies à virus des plantes cultivées.

---

## COMMUNICATIONS

### QUATRE NOUVEAUX SÉROTYPES D'ARIZONA

(**1,4:31:30; 1,33:23:28; 9:22:21 et 9:26:30**)

par L. LE MINOR, P. R. EDWARDS et M. A. FIFE.

(*Institut Pasteur, Paris, et Communicable Disease Center,  
Public Health Service, U. S. Department of Health, Education  
and Welfare, Atlanta, Georgia*)

Les cultures que nous décrivons sont des bacilles à Gram négatif qui possèdent les caractères biochimiques typiques du groupe *Arizona*, c'est-à-dire qu'elles ne produisent ni indole, ni acétyl-méthyl-carbinol, donnent une réaction au rouge de méthyle positive, cultivent sur milieu de Simmons au citrate, produisent de l' $H_2S$ , ne possèdent pas d'uréase, ne cultivent pas sur milieu au KCN, ont une lysine-décarboxylase et liquéfient la gélatine. En employant la méthode de Kauffmann et Petersen [1], ces bactéries n'utilisent pas dans les vingt heures : D-tartrate, citrate, mucate. Elles acidifient avec production de gaz les milieux contenant : glucose, arabinose, rhamnose, xylose, maltose, tréhalose, mannitol et sorbitol. Saccharose, raffinose, salicine, dulcitol, inositol et adonitol ne sont pas fermentés. Les cultures 2887-60 et 2892-60 attaquent le lactose après trois jours d'incubation, la culture 2886-60 après quatre jours, tandis que 2889-60 est sans action décelable sur les

milieux contenant la concentration habituelle (0,5 p. 100) de ce sucre après trente jours d'incubation. Cependant, le milieu lactosé à 10 p. 100 est acidifié par cette souche après trois jours d'incubation. Les souches 2886-60 et 2892-60 utilisent rapidement le malonate, tandis que 2887-60 et 2889-60 ne le font pas.

La culture 2892-60 a été isolée à l'Institut Pasteur de Brazzaville (Congo) par le Dr Ravisse. Elle provient d'un pus d'ostéomyélite humaine. Cette souche est agglutinée au titre homologue par le sérum *Arizona* du groupe 0 : 1,4 et l'absorption fait baisser ce titre de 1/1 000 à 1/100. Les antigènes H sont diphasiques et les phases 1 et 2 sont agglutinées au titre homologue par les sérum H<sub>31</sub> et H<sub>30</sub>. L'absorption les sature totalement. Ces deux antigènes H<sub>30</sub> et H<sub>31</sub> sont habituellement rencontrés chez les *Arizona* dans la phase 2. Dans la formule de cette souche nous avons arbitrairement mis l'antigène 31 comme phase 1 parce qu'il est très voisin de l'antigène z des *Salmonella*, tandis que l'antigène 30 est très proche de l'antigène H : 1,5 des *Salmonella*. L'antigène 0 : 1,4 a des rapports avec l'antigène 0 : 53 des *Salmonella*. La formule assignnée à ce sérotype est : 1,4 : 31 : 30.

La culture 2886 a été isolée par le Dr Huet, de l'Institut Pasteur de Tunis, à partir des excréments d'un serpent. Elle est agglutinée au titre homologue par le sérum *Arizona* 1,33 et la saturation enlève toutes les agglutinines de ce sérum. L'antigène H est diphasique et les phases 1 et 2 sont agglutinées aux titres respectifs par les sérum *Arizona* H<sub>23</sub> et H<sub>28</sub>. Toutes les agglutinines de ces sérum disparaissent lors de l'épreuve d'absorption. La formule antigénique est donc 1,33 : 23 : 28, les phases 1 et 2 ayant respectivement des rapports avec les antigènes H : Iz<sub>23</sub> et ceux des *Salmonella*.

La culture 2887-60 a été isolée à l'Institut Pasteur de Casablanca par le Dr Delage, à partir d'excréments de serpents. Agglutinée au titre homologue par le sérum *Arizona* 0 : 9a, 9b, elle en sature toutes les agglutinines lors de l'épreuve d'absorption. Elle est aussi agglutinée par le sérum 0 : 9a, 9c, mais il reste après absorption un taux élevé d'agglutinines. L'antigène H est diphasique, les phases 1 et 2 étant agglutinées aux titres respectifs par les sérum *Arizona* H<sub>22</sub> et H<sub>21</sub>. Les agglutinines sont totalement saturées lors de l'absorption. La formule antigénique est donc 9 : 22 : 21. La phase 1 coagglutine faiblement avec l'antigène H : k des *Salmonella*, tandis que la phase 2 est très proche de l'antigène H : z<sub>35</sub> des *Salmonella*.

La culture 2889-60 fut isolée d'excréments de serpents par le Dr Huet à l'Institut Pasteur de Tunis. L'antigène 0 est identique à celui de la culture précédente et est désigné par 9a, 9b. L'antigène H est diphasique et les phases 1 et 2 sont agglutinées au titre homologue par les sérum *Arizona* H<sub>26</sub> et H<sub>30</sub> et en saturent toutes les agglutinines. La formule antigénique est 9 : 26 : 30. Seul l'antigène de la phase 2 de l'antigène H a des rapports avec un des antigènes reconnus des *Salmonella* : il est très proche de l'antigène 1,5 des *Salmonella*.

**RÉSUMÉ.** — Description de quatre nouveaux sérotypes d'*Arizona*. Tous proviennent d'Afrique. Le type 1,4 : 31 : 30 a été isolé d'un pus d'ostéomyélite humaine, les types 1,33 : 23 : 28, 9 : 22 : 21 et 9 : 26 : 30 d'excréments de serpents.

## SUMMARY

FOUR NEW *Arizona* SEROTYPES  
 (1,4 : 31 : 30 ; 1,33 : 23 : 28 ; 9 : 22 : 21 and 9 : 26 : 30).

Description of four new *Arizona* serotypes isolated in Africa. Type 1,4 : 31 : 30 was isolated from the pus of a human osteomyelitis ; types 1,33 : 23 : 28 ; 9 : 22 : 21 and 9 : 26 : 30, from snakes excreta.

## BIBLIOGRAPHIE

[1] KAUFFMANN (F.) et PETERSEN (A.). *Acta path. microb. scand.*, 1956, **38**, 481.

**LES GROUPES SANGUINS DES ÉQUIDÉS DU TCHAD**

par M<sup>me</sup> L. PODLIACHOUK et R. QUEVAL.

(Centre d'Etude des Groupes Sanguins des Animaux, Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins, Institut Pasteur, Paris.  
 et Laboratoire de Farcha, Fort-Lamy, Tchad)

L'étude de la répartition des antigènes érythrocytaires chez les chevaux suivant la race a été abordée par plusieurs auteurs dont Schermer (1928), Hofe (1934) et Lehnert (1939) [2]. A cette époque, le nombre des antigènes équins connus était très petit. Chacun de ces auteurs utilisait une nomenclature qui lui était propre ; aussi est-il impossible de comparer les divers résultats obtenus.

L'un de nous avec Eyquem [3], en étudiant les groupes sanguins des équidés, a individualisé dix antigènes érythrocytaires équins. La nomenclature a été créée pour tous les équidés à la fois : cheval, âne, mulet et bardot. Ainsi les antigènes ont été désignés par les lettres de l'alphabet dans l'ordre chronologique de leur découverte. Les antigènes A, C, D, E, F, G, H, I, J et K sont spécifiques de l'espèce cheval ; tandis que B est spécifique de l'âne. On peut les retrouver tous chez le mulet ou le bardot.

La répartition des antigènes érythrocytaires a été étudiée chez 712 chevaux de l'annexe de l'Institut Pasteur de Garches (animaux appartenant à des races diverses), chez 47 chevaux de race ardennaise et chez 162 pur sang.

La fréquence des divers antigènes globulaires varie sensiblement avec la population étudiée. Ainsi, la fréquence la plus élevée de l'antigène D a été observée dans la race ardennaise (0,51) ; chez les chevaux de

Garches elle n'est que de 0,12, et 0 chez les pur sang. La fréquence de l'antigène E, qui est de 0,31 chez les chevaux de Garches et de 0,20 chez les pur sang, n'est que de 0,02 dans la race ardennaise.

Depuis, à notre connaissance, seul Sirbu [7], en Roumanie, a étudié la répartition des antigènes érythrocytaires équins dans six races différentes, désignées dans son ouvrage sous les noms ci-dessous : Trotteur, Nonius, Arabe, Pur Sang Galop, Ardennaise et Commune. Il a effectué cette étude à l'aide de six agglutinines isolées par lui, déterminant les facteurs A, B, C, D, E et F selon sa nomenclature.

Nous avons pu comparer les sérum de référence préparés par l'un de nous à l'Institut Pasteur à ceux de Sirbu, et avons constaté que sur ses six anticorps, cinq étaient identiques aux nôtres [5].

L'identification des sérum de référence a rendu possible la comparaison des résultats obtenus par Sirbu avec les nôtres. La fréquence du facteur D dans la race ardennaise et chez les pur sang, est semblable à celle observée en France : elle est la plus forte chez les premiers et nulle chez les seconds. Les facteurs A et B de Sirbu, qui correspondent à nos A et C, sont les plus fréquents dans toutes les populations étudiées par Sirbu et par l'un de nous.

L'étude des groupes sanguins des équidés (chevaux et ânes), provenant de la République du Tchad (Afrique Equatoriale Française), nous a donné les premiers résultats ci-dessous.

**CHEVAUX.** — La presque totalité de la population chevaline de la République du Tchad dérive de deux grandes races : aryenne et mongolique. Les divers types étant souvent métissés entre eux, le cheptel chevalin constitue une population assez peu homogène.

Notre première étude porte sur 59 de ces chevaux. La répartition des facteurs érythrocytaires est présentée au tableau I.

Ces 59 chevaux n'appartenant à aucune race définie, il nous semble que la population hétérogène des chevaux de Garches se prête le mieux à l'étude comparative de répartition des antigènes chez les chevaux du Tchad et de la métropole.

Le tableau I montre que la fréquence des divers facteurs globulaires chez les chevaux du Tchad ne diffère pas beaucoup de celle observée chez les chevaux de Garches.

Les isoagglutinines sont rares dans le sérum des chevaux du Tchad examinés, fait déjà constaté lors des travaux antérieurs.

**ÂNES.** — Les groupes sanguins des ânes ont été antérieurement étudiés par l'un de nous avec Eyquem [4]. Au cours de cette étude qui a porté sur 135 mulets et 78 ânes, un seul antigène érythrocytaire asin B a pu être individualisé. La fréquence du facteur B varie avec la race : elle est la plus élevée dans la race poitevine et très faible dans la race catalane. Chez les ânes de Paris, population hétérogène, la fréquence du B est de 0,62.

En Afrique Equatoriale Française, la République du Tchad est pratiquement la seule à posséder des ânes ; ceux-ci constituent une population apparemment homogène.

Notre étude a porté sur 31 ânes du Tchad. Le facteur érythrocytaire B a été trouvé dix-huit fois : sa fréquence est donc de 0,58.

La présence d'isoagglutinine anti-B dans le sérum de ces animaux est très fréquente. Elle était décelée sept fois dans le sérum de 13 ânes B négatifs, tandis qu'au cours d'une étude précédente [1] sur les ânes de France et de Tunisie, elle a été décelée une seule fois dans le sérum de 21 ânes B négatifs.

En outre, nous avons pu individualiser une nouvelle isoagglutinine naturelle spécifique de l'espèce asine. Nous l'avons désignée anti-M ; elle détermine le facteur M. Sur 25 ânes du Tchad examinés, 22 se sont

TABLEAU I. — Répartition des facteurs érythrocytaires chez les chevaux du Tchad et de Garches.

ANTIGÈNE ÉRYTHROCYTAIRE	FRÉQUENCE	
	TCHAD	GARCHE
Antigène A . . . . .	0,86	0,75
Antigène C . . . . .	0,88	0,86
Antigène D . . . . .	0,02	0,12
Antigène E . . . . .	0,17	0,31
Antigène F . . . . .	0,92	0,81
Antigène H . . . . .	0,20	0,16
Antigène J . . . . .	0,27	0,21

révélés M positifs et 3 seulement M négatifs. Ainsi, la fréquence du facteur M chez les ânes du Tchad est de 0,89. Chez 2 des 3 animaux M négatifs, le sérum contient l'isoagglutinine anti-M.

CONCLUSION. — Cette étude préliminaire des groupes sanguins des équidés du Tchad montre que :

1° La fréquence des facteurs érythrocytaires équins étudiés ne diffère pas beaucoup de celle observée dans la population hétérogène des chevaux de la métropole.

2° La présence d'isoagglutinines naturelles dans le sérum d'âne du Tchad est beaucoup plus fréquente que chez les ânes de la métropole et de Tunisie, ce qui a rendu possible l'individualisation du second antigène érythrocytaire asin nommé M.

RÉSUMÉ. — L'étude de 59 chevaux et 31 ânes du Tchad a montré que la répartition des facteurs érythrocytaires chez les chevaux du Tchad ne diffère pas beaucoup de celle observée chez les chevaux de la métropole. L'étude sérologique a permis d'individualiser un second antigène érythrocytaire asin, nommé M.

## SUMMARY

## BLOOD GROUPS OF HORSES AND DONKEYS IN THE TCHAD REPUBLIC.

Blood samples of fifty nine horses and thirty one donkeys of the Tchad Republic have been studied. The distribution of red cell factors in horses is not very different from the one observed in France. A second blood group antigen, the «M» antigen, has been identified in donkeys by means of serological studies.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 621.
- [2] PODLIACHOUK (L.). *Thèse de doctorat ès sciences*, Paris, 1957.
- [3] PODLIACHOUK (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 7.
- [4] PODLIACHOUK (L.) et EYQUEM (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 966.
- [5] PODLIACHOUK (L.), SIRBU (Z.), KOWNACKI (M.) et SZENIAWSKA (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 861.
- [6] RECEVEUR (P.). [Communication personnelle.]
- [7] SIRBU (Z.). *Inst. Path. Hyg. Anim.*, 1959, **9**, 189.

Les communications suivantes paraîtront en Mémoire dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**L'identification des Mycobactéries par l'épreuve de réduction des nitrates**, par H. BOISVERT.

**Virulence comparée pour les vers à soie (*Bombyx mori* L.) de quelques variétés de *Bacillus cereus* Frank. et Frank. entomophages et cristallophores et de leurs inclusions cristallines**, par C. TOUMANOFF et J. DURAND.

**Cycle vital de bactéries phytopathogènes adaptées au milieu marin**, par J. BRISOU et H. VARGUES.

**Toxicité et virulence comparées des formes smooth et rough de *Salmonella typhi* sur embryon de poulet**, par M. DIGEON et M. RAYNAUD.

## AVIS

Le VIII<sup>e</sup> Congrès International de Microbiologie aura lieu à Montréal (Canada), du 19 au 25 août 1962.

Pour tous renseignements s'adresser au Dr N. E. Gibbons, Secrétaire général, National Research Council, Sussex Drive, Ottawa 2, Canada.



DEUTSCHER VERLAG DER WISSENSCHAFTEN, Berlin W8, Niederwalistrasse 39  
annonce la publication de :

*Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie  
(Morphologie, Physiologie und Ökologie der Mikroorganismen)*

Publié par : F. Egami, Tokio ; O. Hoffmann-Ostenhof, Wien ; A. A. Imschenezki, Moskau ; G. Ivanovics, Szeged ; R. W. Kaplan, Frankfurt/M. ; G. W. Kidder, Amherst ; I. Malik, Prag ; G. Pontecorvo, Glasgow ; W. N. Schaposchnikow, Moskau ; J. C. Senez, Marseille.

Rédacteur en chef : W. Schwartz, Greifswald.

Avec la collaboration de : F. H. Fang, Pekin ; M. W. Fedorow, Moskau ; W. Hohnk, Bremerhaven ; N. A. Krassilnikow, Moskau ; S. I. Kusnezow, Moskau ; A. Muller, Greifswald ; C. Oppenheimer, Port Aransas ; I. L. Rabotnowa, Moskau ; M. Taubeneck, Jena ; E. J. Wood, Cronulla.

*Le Journal de Microbiologie Générale* se propose de stimuler les recherches et la coopération internationale dans le domaine de la microbiologie. Il publiera des travaux sur toutes les branches de la microbiologie générale. En particulier, il se propose de publier des travaux d'intérêt général concernant les applications des recherches microbiologiques et la taxinomie.

Seront acceptés :

a) Des travaux originaux n'ayant pas encore été publiés dans d'autres revues ou ne devant pas paraître dans une autre revue sous une forme identique.

b) De brèves communications concernant des résultats nouveaux et importants. Ces articles seront publiés en priorité.

c) Sur accord avec la Rédaction, des revues générales et des analyses d'ouvrages.

Les manuscrits, rédigés et publiés en français, allemand ou anglais, peuvent être adressés directement à la Rédaction ou à l'un des membres du Comité de Lecture.

Le prix du Journal est provisoirement fixé à 17 DM par numéro et 68 DM par tome.

## LIVRES REÇUS

**M. Florkin.** — *Unity and diversity in biochemistry. An introduction to chemical biology.* 1 vol., 397 p., Pergamon Press, Oxford, Londres, New-York, Paris, 1960. Prix : 70 s.

Les premiers chapitres de cet ouvrage traitent des structures biochimiques essentielles, des principales sources d'énergie, des enzymes en général et des réactions clés en biochimie. Cette partie de l'ouvrage constitue l'aspect « Unité » de la biochimie.

Dans les derniers chapitres, l'auteur envisage la diversité biochimique : différenciations biochimiques des différentes cellules d'un même organisme et diversités génotypiques.

Cet ouvrage, quoique pauvre du point de vue références bibliographiques, sera consulté avec profit par tous les biochimistes.

B. H.

*Lobund Reports. Germ free life studies.* Vol. 3, University of Notre-Dame Press, 1960, Notre-Dame, Indiana.

Ce troisième rapport comporte quatre exposés différents reliés en un seul volume.

Le premier exposé, fait par N. R. STOLL, s'intitule *Résumé des études faites par R. W. Glasser (1888-1947) sur la culture aseptique*. L'auteur montre comment GLASSER a réussi la culture pure *in vitro* d'organismes extrêmement divers : de bactéries et de protozoaires vivant à l'état symbiotique ou parasitaire chez des insectes ou des mammifères : ex., *Herpetomonas muscae domesticae*, *Trypanosoma americanum* ; de protozoaires vivant à l'état libre ; d'insectes (*Aedes aegypti*, *Musca domestica*) ; d'helminthes (*Haemonchus contortus*, *Popillia japonica* Newm., ce dernier capable d'un cycle complet *in vitro*).

Le deuxième exposé est une analyse des caractéristiques morphologiques, biochimiques, sérologiques et nutritionnelles des *Leghorn blanches* et *Wyandotte Bantam blanches*, élevées aseptiquement. Il est dû à J. A. REYNIERS, M. WAGNER, T. D. LUCKEY et H. A. GORDON.

Les auteurs estiment qu'avant d'utiliser ces animaux aseptiques à des fins expérimentales, il est indispensable de les bien connaître, de déterminer en quoi ces animaux diffèrent de leurs homologues conventionnels et ce qui, dans les différences observées, revient, d'une part à l'absence de microbes, d'autre part, aux conditions très particulières du milieu dans lesquelles vivent ces animaux aseptiques, telles que : éclairage artificiel, régime alimentaire stérilisé par la vapeur, espace très limité, etc.

C'est une gageure que de résumer en quelques lignes cet ouvrage très analytique. En bref :

1<sup>o</sup> Chez le poulet aseptique : le poids humide des organes, habituellement en contact avec la flore microbienne, est réduit, le poids sec relatif augmenté, alors qu'il n'y a pas de différence au niveau des

autres organes. La teneur en lymphocytes du thymus et de la rate est inchangée. Le nombre de leucocytes circulants est réduit par suite d'une diminution du nombre de lymphocytes et à un moindre degré des monocytes, le nombre des autres types de leucocytes étant le même.

2<sup>o</sup> Les différences biochimiques sont peu importantes : à la partie terminale de l'intestin, le contenu de cet organe possède un poids sec relatif plus faible, une teneur en acide pantothénique et en riboflavine plus élevée, une teneur en acide folique, biotine, niacine plus basse ; les muscles renferment moins de vitamine C, le poumon renferme davantage de matières minérales et de matières grasses.

3<sup>o</sup> La date d'apparition des agglutinines anti-hématies de rat et anti-hématies de lapin est inchangée. Les agglutinines envers les bactéries intestinales (*Paracolobactrum aerogenoides*, *Escherichia coli*) sont absentes, mais à partir de l'âge d'un an, on voit apparaître des agglutinines à l'égard de certains lactobacilles et microcoques, qui préexistent dans l'aliment, avant qu'il soit autoclavé. De petites doses d'anaculture de *Salmonella pullorum* provoquent l'apparition d'anticorps en quantité équivalente et dans le même temps que chez l'homologue non aseptique.

4<sup>o</sup> Les besoins nutritifs qualitatifs du poulet aseptique sont très semblables à celui du poulet non aseptique. Des carences aiguës en vitamines A, D, E, K, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niacine, acide folique, ont pu être obtenues expérimentalement. Le poulet aseptique est un sujet d'expérience particulièrement intéressant pour étudier le métabolisme des vitamines et notamment les relations existant entre le métabolisme de diverses vitamines.

Le troisième exposé est de B. P. PHILIPS et traite de *l'Examen parasitologique des animaux aseptiques du Lobund*. L'examen est entièrement négatif chez les rats, souris, cobayes et poulets, mais, parmi six chiens chez lesquels les examens bactériologiques montrent l'absence de bactéries, cinq se montrent parasités par *Toxocara canis* (état larvaire et adulte) et un par *Ancylostoma caninum* (état larvaire).

Le quatrième exposé, dû à T. D. LUCKEY, M. WAGNER, H. A. GORDON et J. A. REYNIERS, traite de *l'Elevage du dindon aseptique*. Il est intéressant de noter que le dindon monocontaminé par un streptocoque, voit sa croissance considérablement réduite : celle-ci n'est plus que de 60 p. 100 de celle de l'homologue aseptique.

E. S.

**J. Heremans.** — *Les globulines sériques du système γ. Leur nature et leur pathologie.* 1 vol., 340 p., Masson et Cie, Paris, et Arscia S. A., Bruxelles, édit., 1960.

L'auteur commence la monographie en rappelant que l'électrophorèse classique n'est plus une méthode satisfaisante pour l'étude des protéines sérielles. En effet, la nomenclature conventionnelle de l'albumine  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ne correspond plus à l'hétérogénéité que l'on constate à l'étude de ces fractions par les méthodes sérologiques nouvelles : la diffusion dans les gels et l'immuno-électrophorèse. La monographie est consacrée à l'étude, par ces méthodes, des fractions  $\beta_2$  et  $\gamma$  de la protéine

sérique, aussi bien dans le sérum normal que dans le sérum pathologique.

La première partie comprend la description et l'étude critique des méthodes immunologiques nouvelles (l'immuno-électrophorèse et l'appréciation quantitative des protéines par les méthodes de diffusion).

Dans le chapitre II sont décrites les six protéines qui ont la même vitesse de migration que les protéines  $\beta_2$  et  $\gamma$ .

Le chapitre III est consacré à l'étude des anomalies qualitatives de trois de ces protéines qui sont en relation étroite entre elles, à savoir :  $\gamma$ ,  $\beta_{A1}$  et  $\beta_{2M}$ -globulines.

Enfin, dans le chapitre IV sont traitées les modifications quantitatives de ces fractions dans la pathologie.

Le livre contient 72 figures, presque toutes les photographies des résultats immuno-électrophorétiques, très bien reproduites, ainsi que 19 tableaux.

En appliquant des méthodes nouvelles à l'étude du système  $\gamma$  sur un grand nombre de sérums, l'auteur a accumulé un nombre considérable de résultats et par des expériences additionnelles personnelles, spécialement dans la purification des fractions, il est arrivé à des conclusions importantes exposées dans cette excellente monographie.

J. G.

**L. Lison.** — *Histo chimie et cyto chimie animales. Principes et méthodes.*

Vol. I, 3<sup>e</sup> édit., 397 p., 25 fig. Gauthier-Villars, édit., 1960.

Prix : 45 NF.

L'ouvrage n'est pas à présenter, car il est utilisé dans tous les laboratoires d'histologie. Comme les précédentes, cette troisième édition est avant tout une étude critique, écrite dans le but d'aider le chercheur à apprécier la signification et la valeur des techniques mises en œuvre. Les progrès récents de l'histochimie ont été cependant si grands qu'une simple mise à jour du texte précédent a paru insuffisante et que l'auteur a récrit l'ouvrage en entier.

Parmi les innovations introduites dans cette édition, mentionnons le développement d'une section consacrée aux réactions histochimiques de radicaux ou de fonctions chimiques. Les réactions histochimiques, en règle générale, démontrent des radicaux ou des fonctions chimiques et non pas des substances déterminées. C'est afin de faire ressortir ce caractère fondamental de l'investigation histochimique que l'auteur a adopté cette nouvelle présentation pour la première fois dans un ouvrage consacré à l'histochimie. Une autre modification est le regroupement en un appendice, à la fin de l'ouvrage, d'une sélection des techniques les plus courantes ou les plus utiles en histochimie.

J.-C. L.